



Etude mécanistique de la biosynthèse des centres fer-soufre chez *Escherichia coli* : quel rôle pour la protéine SufA ?

Maite Sendra

► To cite this version:

Maite Sendra. Etude mécanistique de la biosynthèse des centres fer-soufre chez *Escherichia coli* : quel rôle pour la protéine SufA ?. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. <tel-00186364>

HAL Id: tel-00186364

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00186364>

Submitted on 9 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
SCIENCES ET GEOGRAPHIE
ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT**

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Chimie / Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Maïté SENDRA

Le 4 Octobre 2007

**Etude mécanistique de la biosynthèse des
centres [Fe-S] chez *Escherichia coli* :**

Quel rôle pour la protéine SufA ?

Composition du jury

Président	:	Dr. Jean Marc MOULIS
Rapporteurs	:	Prof. Frédéric BARRAS Dr. Axel MAGALON
Examinatrice	:	Dr. Cécile BOUTON
Directeur	:	Prof. Marc FONTECAVE
Co-directrice	:	Dr. Sandrine OLLAGNIER-DE CHOUDENS

**Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
CEA – Grenoble
iRTSV/LCBM – CNRS – Université Joseph Fourier**

*« Dans la vie,
rien n'est à craindre,
tout est à comprendre »*

Marie Curie

*« Je n'ai pas échoué,
J'ai juste trouvé 10000 moyens
qui ne fonctionnent pas »*

Thomas Edison

À Fabien

À mes parents

Pour leur soutien inestimable

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marc Fontecave de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques devenu le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, et de m'avoir ainsi permis d'y effectuer ma thèse. Je te remercie pour les réunions de travail très motivantes et les discussions scientifiques très enrichissantes.

Je remercie également, bien évidemment, Sandrine Ollagnier-de Choudens, qui m'a encadrée durant ces 3 années de thèse, auxquelles se sont ajoutés les six mois de stage de DEA. Je te remercie pour tes explications et ta patience, et plus particulièrement durant les premiers mois pendant lesquels tu m'as formée à un domaine que je connaissais mal, la biochimie. J'ai acquis un bon nombre de compétences techniques qui je suis sûre me seront précieuses. Ton suivi régulier tout au long de ma thèse m'a permis d'avancer sur un sujet qui n'était pas facile. Je te remercie également pour ta disponibilité et ta rigueur lors de la rédaction de ce manuscrit (et aussi lors de la préparation de la soutenance) et pour tes conseils judicieux. Merci aussi pour les quelques séances diapos où tu nous a fait découvrir et partager tes incroyables et impressionnantes expéditions.

Je tiens à remercier les différentes personnes qui ont collaboré à mon travail :

Tout d'abord, David Lascoux pour toutes les analyses de spectrométrie de masse. Merci pour ton implication sur mon sujet et pour ton éternelle bonne humeur. Je dois dire qu'avec toi on ne s'ennuie pas et malgré tout on travaille ! Ta « cocote » ou encore « belle blonde » te remercie.

Ensuite, Yiannis Sanakjs pour les analyses de spectroscopie Mössbauer. La distance entre nos deux laboratoires a souvent rendu difficile une bonne interaction et une avancée efficace sur le sujet ; mais je le remercie pour avoir toujours répondu à mes questions, moi qui ne connaissais rien à la spectroscopie Mössbauer, et aussi pour avoir répondu présent pour participer au « Qui est-ce ? ».

Enfin, Wayne Outten et Vibha Gupta pour leur collaboration pour l'obtention de la protéine SufA native métallée, et Vincent Huynh pour les analyses de spectroscopie Mössbauer de cette protéine.

Je tiens à remercier tous les membres du jury, Jean Marc Moulis, Axel Magalon, Frédéric Barras, Cécile Bouton, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie l'ensemble du laboratoire avec tous ses personnages si emblématiques.

Hamid, qui mourrait toujours d'envie de faire mes présentations orales à ma place

Etienne, pour les quelques discussions scientifiques que nous avons eues

*Cathy, pour ta sympathie,
Vincent N, pour ta disponibilité quand je venais te poser quelques questions
Vincent A, pour toutes tes connaissances
Nico, pour toutes nos discussions et ton amitié
Stéphane, pour toutes tes blagues à deux balles
Eric si séduisant en sokol !!
Sans oublier Laurent et Pierre pour leur gentillesse,
ni l'athlétique Olivier,
ou encore Caroline Marchi
et Nathalie pour ta disponibilité.*

Un merci particulier à vous les filles (Alexia, ma super co-bureau ; Emilie et Carole, qui étaient presque aussi mes co-bureau vu qu'on entend tout d'un bureau à l'autre et qu'il nous suffisait de quelques secondes pour rappliquer ; Carine, qui était plus éloignée mais qui avait son tabouret dans notre bureau (D'ailleurs, ces petites réunions express entre nos deux bureaux vont me manquer et je risque de perdre tout mon entraînement dans l'art de la dispersion !)) sans oublier Guni, Florence, Sigolène, Adeline, et bien sûr Chantal) pour tous nos papotages et rigolades et pour les supers pauses goûter, devenues une grande tradition. Un grand merci à toutes pour votre amitié.

Je n'oublie pas non plus Pascal, que je remercie pour sa gentillesse, et Aziz pour ses bonjours enjoués et ses blagues mais aussi pour son thé à la menthe.

J'ai aussi une pensée pour tous ceux qui ont déjà quitté le laboratoire : Yohan, mon guignol préféré, Mathieu, le gentleman instituteur, Julien, pour sa bonne humeur et sa joie de vivre, Caroline Ranquet pour ce qu'on a partagé et pour les soirées Hugh Grant, Tami pour son sourire, Florence L pour sa discrète gentillesse, Florence C et Aurore pour leur accueil et leur sympathie lors de mon arrivée au laboratoire, Xavier mon premier co-bureau, Jon l'inventeur de super nouveaux gros mots.

Pour terminer je voudrais remercier ma famille, Véronique, Jean-Philippe et tout particulièrement mes parents, pour leur soutien permanent (tant pour ma thèse que sur le plan personnel) au cours de ces trois années qui n'ont pas toujours été faciles. Merci également à Nicole et Alain Crémillieux, pour leur gentillesse et leur présence. Un merci particulier à toi Fabien pour ton soutien, ta compréhension et ton amour...et ta patience durant ces trois ans passés à 500 km l'un de l'autre et qui nous ont semblé plutôt très longs.

Sommaire

Abréviations	p.19
Introduction bibliographique : la biosynthèse des centres [Fe-S]	p.23
Introduction générale	p.25
I- Les différents centres fer-soufre [Fe-S]	p.27
I-1- Structure atomique des centres fer-soufre [Fe-S]	p. 27
I-1-1- Les centres [1Fe]	p.27
I-1-2- Les centres [2Fe-2S]	p.28
I-1-3- Les centres [4Fe-4S]	p.28
I-1-4- Les centres [3Fe-4S]	p.28
I-1-5- Les centres complexes	p.29
I-2- Rôles biologiques des centres [Fe-S]	p.30
I-2-1- Les transferts d'électrons	p.30
I-2-2- La catalyse enzymatique	p.31
I-2-3- La régulation de gènes	p.33
I-2-4- Le rôle structural	p.35
I-2-5- Le stockage du fer	p.35
II- La biosynthèse des centres [Fe-S]	p.36
II-1- Introduction	p.36
II-2- Les différentes machineries chez les procaryotes	p.37
II-2-1- Historique et description des différentes machineries	p.37
II-2-2- Distribution des systèmes de maturation des protéines [Fe-S] chez les organismes procaryotes	p.48
II-3- La maturation des protéines [Fe-S] chez les organismes eucaryotes	p.49
II-4- Le système SUF	p.56
II-4-1- Analyses physiologiques	p.56
II-4-2- L'importance du système SUF	p.58
II-4-3- La régulation de l'opéron <i>suf</i>	p.59
II-4-4- Les protéines Suf	p.61
II-4-4-a- Le complexe <i>SufSE</i>	p.62
II-4-4-b- Le complexe <i>SufBCD</i>	p.65

II-4-4-c- La protéine SufA	p.67
III- Objectifs de la thèse : Etude moléculaire de la formation du centre [Fe-S] dans SufA.....	p.71
Matériels et Méthodes	p.73
I- Matériels biologiques	p.75
I-1-Souches bactériennes	p.75
I-2- Vecteurs de surexpression	p.76
I-3- Milieux de culture	p.77
II- Méthodes de biologie moléculaire	p.77
II-1- Introduction d'ADN dans <i>E. coli</i>	p.77
II-1-1- Préparation des cellules compétentes	p.77
II-1-2- Transformation des cellules compétentes	p.77
II-1-3- Préparation d'ADN plasmidique	p.78
II-2- Amplification par PCR - Mutagenèse dirigée	p.78
II-2-1- Amplification des plasmides pET-AC _{50S} , pET-AC _{114S} , pET-AC _{116S} , pET-AC _{116A} et pET-A _{STOP} contenant une mutation sur le gène <i>sufA</i>	p.78
II-2-2- Analyse des produits PCR : gel d'agarose et séquençage	p.80
III- Obtention des protéines	p.81
III-1- Purification des protéines SufA, SufE, SufS et IscA.....	p.82
III-1-1- Surexpression des protéines SufA, SufE, SufS et IscA	p.82
III-1-2- Préparation des extraits protéiques	p.82
III-1-3- Etapes chromatographiques	p.82
III-1-3-a- Purification des protéines SufA, SufA _{C50S} , SufA _{C114S} , SufA _{C116S} , SufA _{C116A} , SufE et SufS	p.83
III-1-3-b- Purification de la protéine SufA ne possédant pas d'étiquette polyhistidine (SufA _{STOP})	p.84
III-2- Purification de la protéine SufA à partir de l'opéron <i>suf</i>	p.85

III-2-1- Surexpression de l'opéron <i>suf</i>	p.85
III-2-2- Préparation des extraits protéiques	p.85
III-2-3- Chromatographie : échange d'anions	p.86
III-3- Purification de la ferrédoxine	p.86
 IV- Méthodes biochimiques	 p.86
IV-1- Préparation de la protéine SufA chargée en soufre	p.86
IV-2- Digestion enzymatique de la protéine SufA	p.87
IV-3- Alkylation de la protéine SufA apo et soufrée (SufA-SSH)	p.87
IV-4- Etude d'interactions entre SufA et SufS/SufE	p.88
IV-5- Préparation de la protéine SufA chargée en fer	p.88
IV-6- Préparation de la protéine IscA chargée en fer	p.89
IV-7- Reconstitution chimique du centre [Fe-S] dans SufA	p.89
IV-8- Préparation de la forme apo de la ferrédoxine	p.89
IV-9- Transfert du cluster [Fe-S] de holoSufA à apoFdx	p.90
IV-10- Préparation de la forme apo de la Spore Photoproduit Lyase	p.90
IV-11- Transfert du cluster de holoSufA à apoSPL	p.90
 V- Analyses biochimiques	 p.91
V-1- Dosage des protéines	p.91
V-2- Dosage du fer dans les protéines	p.92
V-3- Dosage du soufre dans les protéines	p.93
V-4- Electrophorèse SDS-PAGE	p.94
 VI- Techniques physico-chimiques	 p.95
VI-1- Spectrophotométrie UV-visible	p.95
VI-2- Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique	p.96
VI-3- Spectroscopie Mössbauer	p.98
VI-4- Spectrométrie de masse	p.100
VI-5- Spectroscopie Raman de résonance	p.104
VI- 6- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire	p.105

Partie I- Etude du mécanisme de formation des centres [Fe-S] dans SufA

.....p.107

Chapitre I- Obtention des protéines SufA, SufE et SufSp.111**I- Obtention des protéines SufA, SufE, SufS**p.113**I-1- Obtention des différents plasmides et surexpression**p.113**I-2- Purification des protéines recombinantes**p.114**I-2-1- Les protéines SufA_{his}, SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}, SufA_{C116A}**p.114*I-2-1-a- La protéine SufA_{his}*p.114*I-2-1-b- Les protéines mutantes, SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}, SufA_{C116A}*

.....p.116

I-2-2- La protéine SufA_{STOP}p.118**I-2-3- Les protéines SufS et SufE**p.118**II- Caractérisation biochimique des protéines SufA, SufE et SufS**p.119**II-1- Les protéines SufA (sauvages et mutantes)**p.119**II-1-1- Spectroscopie d'absorption UV-visible**p.120**II-1-2- Quantification du fer et du soufre labiles**p.121**II-2- Les protéines SufE et SufS**p.122**Chapitre II- Etude de la fixation du soufre dans SufA**p.125**Introduction**p.127**I- Le transfert de soufre de SufSE à SufA**p.127**I-1- Analyses préliminaires de spectrométrie de masse**p.127**I-2- Caractérisation du donneur de soufre, le complexe SufSE**p.128**I-2-1- Etude par spectrométrie de masse**p.128**I-2-2- Dosage de soufre dans SufSE-SSH**p.130**I-3- Etude de la fixation de soufre sur SufA**p.130**I-3-1- Conditions « stoechiométriques »**p.130**I-3-2- Conditions catalytiques**p.133**I-3-3- Influence de l'oxygène sur le transfert de soufre**p.134

I-3-4- Etude de la spécificité du transfert de soufre	p.134
<i>I-3-4-a- Comparaison de différents donneurs de soufre</i>	p.134
<i>I-3-4-b- Comparaison de différents accepteurs de soufre</i>	p.135
<i>I-3-4-c- Conclusion</i>	p.137
I-3-5- Etude d'interactions entre SufSE et SufA	p.137
II- Détermination des sites de fixation du soufre	p.139
II-1- Etude de la fixation de soufre sur SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}	p.139
II-2- Etude de la fixation de soufre par spectrométrie MALDI-TOF	p.141
Discussion	p.142
<u>Chapitre III- Etude de la fixation du fer dans SufA</u>	p.147
Introduction	p.149
I- Etude de la fixation de Fe(II) sur SufA	p.149
I-1- Caractérisation biochimique et spectroscopique	p.149
I-1-1- Dosages colorimétriques.....	p.149
I-1-2- Spectroscopie UV-visible	p.150
I-1-3- Spectroscopie Mössbauer	p.150
<i>I-1-3-a- Etude de la forme SufA-Fe</i>	p.151
<i>I-1-3-b- La protéine SufA-Fe alkylée</i>	p.153
<i>I-1-3-c- Conclusion quant à la localisation du Fe(II)</i>	p.154
I-2- Effet de l'EDTA	p.154
I-3- Calcul de la constante d'association de SufA_{his} pour le Fe(II)	p.156
I-4- Expériences complémentaires	p.162
I-4-1- Caractérisation des protéines mutées SufA _{C50S} , SufA _{C114S} , SufA _{C116S} et SufA _{C116A}	p.162
I-4-2- La protéine SufA _{STOP}	p.162
II- Etude de la fixation du Fe(III)	p.165
II-1- Dosages colorimétriques et spectroscopie UV-visible	p.165
II-2- Spectroscopie Mössbauer	p.167

II-3- Effet de l'EDTA	p.168
II-4- Calcul de la constante d'association de SufA_{his} pour le Fe(III).....	p.169
 III- Dosages de fer dans IscA et comparaison avec SufA	 p.169
III-1- Etude de la fixation du Fe(II) sur IscA en conditions anaérobies	p.169
III-2- Expériences en conditions aérobies	p.171
 Discussion	 p.173
 <u>Chapitre IV- Etude de la formation du cluster dans SufA</u>	 p. 177
 Introduction	 p.179
 I- Formation du centre [Fe-S] à partir de chacune des formes intermédiaires.....	 p.180
I-1- Formation du centre [Fe-S] à partir de SufA-SSH après ajout de fer	p.180
I-1-1- Source de fer : sel de Mohr	p.180
I-1-2- Influence du complexe SufBCD sur l'étape de formation du centre [Fe-S] à partir de la forme SufA-SSH	p.182
I-1-3- Apport du fer par CyaY	p.182
I-2- Formation du centre [Fe-S] à partir de SufA-Fe après ajout de soufre	p.182
I-3- Réactivité des persulfures/polysulfures sur SufA-SSH vis-à-vis des agents alkylants.....	p.183
 II- Formation du centre [Fe-S] en milieu réducteur.....	 p.188
II-1- A partir de la forme SufA-SSH	p.189
II-1-1- Effet du DTT	p.189
II-1-2- Effet du système NADPH/thiorédoxine/thiorédoxine réductase	p.191
II-2- A partir de la forme SufA-Fe	p.191
II-3- Etude d'une forme de SufA à la fois chargée en fer et en soufre	p.193
 Discussion	 p.195

Partie II- Etude de la nature du centre métallique dans SufA	p.201
Introduction	p.203
I- Caractérisation de SufA après reconstitution chimique	p.203
I-1- Caractérisation biochimique et spectroscopique	p.203
I-2- Etude du transfert des centres [Fe-S] de SufA	p.209
II- Obtention d'une protéine SufA native métallée	p.213
II-1- Purification de SufA en conditions anaérobies	p.213
II-2- Purification de SufA en présence de l'opéron <i>isc</i>	p.214
II-3- Obtention de la protéine SufA purifiée à partir d'un plasmide codant pour l'ensemble de l'opéron <i>suf</i>	p.215
II-3-1- Transformation et surexpression	p.215
II-3-2- Purification de SufA	p.215
II-3-3- Caractérisation biochimique et spectroscopique	p.216
II-3-4- Spectroscopie Mössbauer	p.217
II-3-5- Spectroscopie Raman	p.218
II-3-6- Etude de la maturation de la Fdx à partir SufA	p.220
Discussion	p.221
Partie III- Etude de la nature des ligands du centre [Fe-S] dans SufA	p.229
Introduction	p.231
I- Purification des protéines mutées	p.231
II- Reconstitution chimique de chaque simple mutant Cys→Ser	p.232
II-1- Caractérisation par spectroscopie UV-visible	p.232
II-2- Spectroscopie Mössbauer	p.233

III- Etude du transfert du centre [Fe-S]	p.235
III-1- A la ferrédoxine	p.235
III-2- A la Spore Photoproduct Lyase	p.236
IV- Apports des études RMN	p.237
Discussion	p.240
Conclusion générale	p.245
Annexes	p.253
Références bibliographiques	p.259
Publication	p.277

Abréviations

Abréviations

Å	Angström
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APS	Ammonium PerSulfate
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Acide TriPhosphate
BET	Bromure d'Ethidium
CaCl₂	Chlorure de Calcium
DMPD	DiMéthyl Phénylène Diamine
DO	Densité Optique
DTT	DiThioThreitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine TétraAcétique
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
ESI	Ionisation par Electrospray
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HCl	Acide Chloridrique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Pression
IPTG	IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside
ISC	Iron Sulfur Cluster
Kd	Constante de dissociation
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
mL	MilliLitre
mM	MilliMolaire
mV	MilliVolt
μL	MicroLitre
μM	MicroMolaire
NaCl	Chlorure de Sodium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite
ng	Nanogramme

NH₄Cl	Chlorure d'ammonium
NIF	Nitrogen Fixation
Ni-NTA	Nickel- Acide NitiloTriacétique
nm	Nanomètre
pb	Paire de Bases
PCA	Acide PerChlorique
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
PLP	Pyridoxal Phosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
Rpm	Tours par minute
SAM	S-Adénosyl Méthionine
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate polyAcrylamide Gel Electrophoresis
SUF	mobilisation of Sulfur
TEMED	N, N, N', N'-TétraMéthylEthylène Diamine
TOF	Time Of Flight (Temps de vol)
UV	Ultra Violet

Introduction bibliographique

Introduction générale

Les métalloprotéines constituent une grande famille de protéines qui sont ubiquitaires chez tous les organismes vivants. L'intérêt pour cette classe de protéines s'est accru très fortement durant ces dernières années lorsqu'il a été découvert qu'elles jouaient des rôles importants voire vitaux au sein de la cellule. On distingue, par exemple, des métalloprotéines à Cuivre, à Nickel, à Fer... (Messerschmidt *et al.*, 2001)

Métal	Métalloprotéine	Fonction
<i>Cuivre</i>	Superoxyde dismutase Hémocyanine	Dismutation du superoxyde Transport d'oxygène
<i>Nickel</i>	Hydrogénase Uréease	Oxydation réversible de l'hydrogène Hydrolyse de l'urée
<i>Manganèse</i>	Arginase Superoxyde Dismutase	Hydrolyse de l'arginine Dismutation du superoxyde
<i>Molybdène</i>	Nitrogénase Sulfite réductase	Réduction de l'azote en ammoniacque Conversion du sulfite en sulfate
<i>Cobalt</i>	Glutamate mutase Méthionine synthase	Conversion du L-glutamate en L-méthylaspartate Conversion de l'homocystéine en méthionine
<i>Fer</i>	Hémoglobine Ferritine <i>Protéines Fer-Soufre</i>	Transport d'oxygène Stockage du fer A voir ...

Tableau 1 : exemples de métalloprotéines et leur fonction associée

Parmi les métalloprotéines à fer se trouvent les protéines à fer héminique (telles que l'hémoglobine ou le cytochrome P450) et non héminique dont font partie les protéines à centre fer-soufre. Les protéines fer-soufre ([Fe-S]) sont sans doute parmi les premiers catalyseurs que la nature ait utilisés. Il semblerait, en effet, que les conditions extrêmes régnant dans l'atmosphère primitive aient favorisé une chimie du fer et du soufre (Wächtershäuser, 1990). Paradoxalement, ces entités ancestrales, et fondamentales dans le monde du vivant, n'ont été découvertes que tardivement. Il a fallu attendre les années 1960 pour que les protéines [Fe-S] soient mises en évidence, à travers les ferrédoxines, reconnues alors pour leur implication dans des réactions d'oxydo-réduction (Mortenson *et al.*, 1962). Depuis, de très nombreuses protéines [Fe-S] ont été décrites. En effet, durant ces dernières années, la connaissance de ces biomolécules a progressé de façon exponentielle grâce à la conjugaison d'études biochimiques, spectroscopiques et cristallographiques. Ces études ont révélé une grande diversité des centres [Fe-S] au niveau de leurs structures ainsi que de leurs fonctions biologiques. Ainsi, aujourd'hui, beaucoup de connaissances sur les propriétés

physicochimiques et les rôles physiologiques des protéines [Fe-S] ont été acquises. Un bilan concernant les structures et fonctions des centres [Fe-S] est présenté dans les quelques pages qui suivent.

I- Les différents centres fer-soufre

I-1- Structure atomique des centres fer-soufre

Les centres [Fe-S], présents dans les sites actifs des protéines, résultent de l'assemblage d'atomes de fer dans différents états d'oxydation (fer ferreux Fe^{2+} ou fer ferrique Fe^{3+}) et d'ions sulfures dits soufres inorganiques, en stoechiométrie variable. Ces agrégats forment une structure plus communément appelée « cluster » [Fe-S].

Ils sont en général reliés à la protéine par des groupements thiols de cystéine. Toutefois, des ligands de nature différente peuvent intervenir. En effet, il existe de plus en plus d'exemples dans lesquels les ligands du cluster sont des atomes d'azote appartenant à des histidines ou des arginines (Berkovitch *et al.*, 2004; Gurbiel *et al.*, 1991) ou bien des atomes d'oxygène fournis par des résidus aspartate, sérine, glutamine ou tyrosine (Brereton *et al.*, 1999; Calzolari *et al.*, 1995; Dobritsch *et al.*, 2001). Enfin, la coordination des atomes de fer par des ligands exogènes a pu être observée. Ces ligands peuvent être le substrat de l'enzyme (comme le citrate dans le cas de l'aconitase), un cofacteur (la S-adénosylméthionine pour les enzymes de la famille des « Radical-SAM ») ou encore des molécules d'eau (Lauble *et al.*, 1992; Layer *et al.*, 2003).

Différents types de centres [Fe-S] ont été observés au sein des protéines (Beinert, 2000) ; les plus communément rencontrés sont décrits ci-après.

I-1-1-Les centres [1Fe]

Ce type de centre est constitué d'un atome de fer central dans une géométrie pseudo-tétraédrique relié à quatre atomes de soufre de résidus cystéines de la chaîne polypeptidique. Ainsi, les centres [1Fe] ne correspondent pas à proprement parler à la définition d'un centre [Fe-S] puisqu'ils ne possèdent pas de soufre inorganique. On les rattache toutefois à la famille des protéines [Fe-S] en raison de leur symétrie et de leur environnement exclusivement soufré. Les centres [1Fe] existent dans deux états d'oxydation, suivant que l'atome de fer est ferrique (état oxydé) ou ferreux (état réduit).

I-1-2- Les centres [2Fe-2S]

Dans ce cas, les deux atomes de fer sont reliés, selon une géométrie tétraédrique, à deux soufres inorganiques et à deux autres ligands appartenant à la chaîne protéique, le plus souvent des soufres de cystéine. Quelle que soit la nature des ligands, les centres [2Fe-2S] existent dans deux états rédox. A l'état oxydé (noté $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$), les deux atomes de fer sont sous forme ferrique (Fe^{3+}). A l'état réduit (noté $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$), la charge est localisée sur un des deux atomes de fer : l'un est sous forme ferrique (Fe^{3+}), l'autre est sous forme ferreuse (Fe^{2+}).

I-1-3- Les centres [4Fe-4S]

Ils s'organisent selon une structure cubique dans laquelle chaque sommet porte successivement un atome de fer et un atome de soufre inorganique. Ainsi, chacun des quatre atomes de fer est coordonné à trois atomes de soufre labile et un groupement thiolate de cystéine appartenant à la chaîne polypeptidique. Ces centres existent sous trois états d'oxydation différents, constituant alors les deux couples rédox suivants : $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ et $[4\text{Fe-4S}]^{3+/2+}$. Les protéines contenant ce dernier couple sont appelées HiPIPs (High Potential Iron Protein) en raison de la valeur élevée de leur potentiel d'oxydoréduction. Enfin, on peut noter que la plupart des protéines [4Fe-4S] sont isolées dans l'état $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$.

I-1-4- Les centres [3Fe-4S]

Les centres [3Fe-4S] ont été mis en évidence plus tardivement. Ils sont la preuve de l'existence de clusters non stoechiométriques. Ils existent sous deux états rédox : $[3\text{Fe-4S}]^{1+/0}$. Bien que les clusters [3Fe-4S] puissent être des composants intrinsèques actifs des protéines, ils sont le plus souvent le résultat d'une dégradation oxydative d'un centre [4Fe-4S]. Dans ce cas, le centre [3Fe-4S] inactif a, en général, la capacité de reformer un centre [4Fe-4S] en présence de Fe^{2+} . Cette facilité d'interconversion est notamment mise à contribution dans des processus de régulation de gènes où chaque forme présente des propriétés différentes.

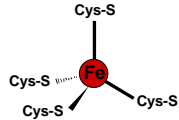
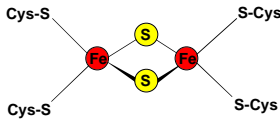
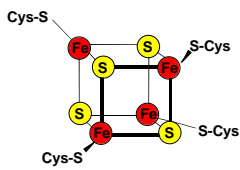
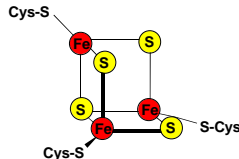
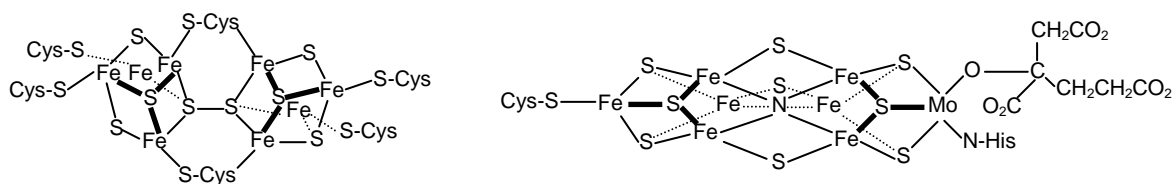
[1Fe]	[2Fe-2S]	[4Fe-4S]	[3Fe-4S]
			
Etats rédox			
Fe^{2+} Fe^{3+}	$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{3+} \rightarrow [\text{2Fe-2S}]^{2+}$ $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} \rightarrow [\text{2Fe-2S}]^{1+}$	$3\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} \rightarrow [\text{4Fe-4S}]^{3+}$ $2\text{Fe}^{3+}/2\text{Fe}^{2+} \rightarrow [\text{4Fe-4S}]^{2+}$ $\text{Fe}^{3+}/3\text{Fe}^{2+} \rightarrow [\text{4Fe-4S}]^{1+}$	$3\text{Fe}^{3+} \rightarrow [\text{3Fe-4S}]^{1+}$ $2\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} \rightarrow [\text{3Fe-4S}]^0$
Potentiels rédox Par rapport à l'ENH₁ à pH 7_z			
+20 à -100 mV	-100 à +400 mV	-100 à -700 mV (+50 à 400 mV pour les HiPIPs)	-60 à -460 mV

Tableau 2 : Les différents centres [Fe-S] et leurs propriétés

I-1-5- Les centres complexes

Certaines protéines possèdent des clusters plus « exotiques » c'est à dire qu'ils contiennent un nombre d'atomes de soufre et de fer supérieur à 4 et/ou contiennent des hétéroatomes tels que le molybdène ou le nickel. Ces centres métalliques complexes sont impliqués dans des réactions rédox exceptionnelles d'activation de substrats très stables (tels que H₂, CO₂). Les centres [8Fe-7S] et [Mo-7Fe-9S] présents chez la nitrogénase en sont des exemples (Peters *et al.*, 1997; Seefeldt *et al.*, 2004).

**Figure 1 :** structure atomique des centres [8Fe-7S] (Peters *et al.*, 1997) et [Mo-7Fe-9S] (Seefeldt *et al.*, 2004) présents dans la nitrogénase

Ainsi, les centres [Fe-S] montrent une grande diversité de structure. Mais il est intéressant de noter que la très grande majorité des protéines [Fe-S] (environ 90 %) possèdent

des centres de type [4Fe-4S]. La raison pour laquelle la nature a favorisé sélectivement ce type de centre reste inconnue.

Il est également intéressant de noter qu'un certain nombre de protéines [Fe-S] possèdent plusieurs centres [Fe-S]. Le cas le plus remarquable est celui du complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) de la chaîne respiratoire : il contient 8 ou 9 clusters [Fe-S] qui servent de relais pour permettre la circulation des électrons sur une longue distance (plus de 100 Å) au sein de la protéine (Hinchliffe and Sazanov, 2005).

Enfin, il convient de remarquer qu'un grand nombre de séquences polypeptidiques caractéristiques, à partir desquelles la présence d'un centre [Fe-S] au sein d'une protéine peut être prédite, a pu être mis en évidence. Ainsi pour 110 protéines [Fe-S] identifiées chez *E. coli*, plus de 30 motifs ont été observés (Fontecave, 2006). La séquence la plus fréquemment rencontrée est CX₂CX₂CX₃C, présente dans les systèmes impliqués dans le transfert d'électrons. On peut également citer le motif de type CX₃CX₂C caractéristique d'une famille d'enzymes, les protéines « Radical-SAM », dont je détaillerai la fonction un peu plus loin. Il existe néanmoins des protéines [Fe-S] dont le motif de coordination du cluster ne correspond à aucune séquence consensus connue et répertoriée. Ceci rend difficile la prédiction et l'identification de nouvelles protéines [Fe-S], en se basant seulement sur leur séquence en acides aminés et souligne la très grande flexibilité de ce type de protéine lors de la sélection des sites de coordination du cluster.

I-2- Rôles biologiques des centres [Fe-S]

Les protéines [Fe-S] sont impliquées dans des processus biologiques extrêmement variés. En fait, plus de 50 % d'entre elles sont impliquées dans des transferts d'électrons. Ce fut d'ailleurs la première fonction démontrée pour les centres [Fe-S]. Cependant, la découverte et l'étude de nombreuses protéines [Fe-S] a permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions biologiques, telles que la catalyse rédox ou non rédox, la régulation de gènes ou encore le maintien de la structure protéique.

I-2-1- Les transferts d'électrons

Le rôle le plus connu des centres [Fe-S] est le transfert d'électrons. Ce fut d'ailleurs la seule et unique fonction reconnue pour les centres [Fe-S] pendant de nombreuses années. Les

réactions de transferts d'électrons sont essentielles dans de nombreux processus biologiques incluant par exemple la photosynthèse ou la respiration (Johnson *et al.*, 2005).

Cette fonction est basée sur la capacité des atomes de fer du cluster à passer d'un état réduit (Fe^{2+}) à un état oxydé (Fe^{3+}) et inversement. Ainsi, les clusters [Fe-S] peuvent facilement accepter des électrons et/ou les donner à d'autres entités. Ils peuvent servir de transporteurs d'électrons soit au sein d'une même protéine (on parle de transfert intramoléculaire) soit entre deux ou plusieurs partenaires protéiques (on parle alors de transfert intermoléculaire, celui-ci pouvant s'effectuer sur une longue distance).

Les protéines impliquées dans des processus rédox contiennent tout type de centre [Fe-S] avec néanmoins une préférence pour les centres [2Fe-2S], dont le prototype est la ferrédoxine.

I-2-2- La catalyse enzymatique

◆ *La catalyse non rédox*

L'exemple classique pour ce type de fonction est celui de l'aconitase du cycle de Krebs (Switzer, 1989). L'aconitase catalyse des réactions d'hydratation/déshydratation via son centre [4Fe-4S] dans lequel un des quatre atomes de fer du cluster intervient en tant qu'acide de Lewis : il possède un site de coordination vacant, l'une de ses orbitales pouvant accepter un doublet électronique ; ainsi, il peut lier le substrat de la réaction, stabiliser l'état intermédiaire formé et ainsi catalyser la réaction de transformation de l'isocitrate en citrate.

◆ *La catalyse rédox*

Les centres impliqués dans ce type de processus sont représentés essentiellement par les protéines de la super-famille des radical-SAM, particulièrement étudiées au laboratoire. Cette famille comprend plusieurs centaines d'enzymes qui interviennent dans des processus biologiques très variés tels que la synthèse de vitamines, d'antibiotiques ou encore des réactions sur l'ADN ou les ARN (Sofia *et al.*, 2001). On peut citer la RiboNucléotide Réductase, qui catalyse la réduction des quatre ribonucléotides en désoxyribonucléotides correspondants (Fontecave *et al.*, 2002) ; la biotine synthase, qui catalyse la dernière étape de formation de la biotine à partir de la déthiobiotine (Fontecave *et al.*, 2003) ; la Spore Photoproduit Lyase, impliquée dans des processus de réparation de l'ADN chez les spores de

Bacillus (Chandor *et al.*, 2006) ; ou encore la méthylthiotransférase MiaB permettant des modifications des ARN de transfert (Pierrel *et al.*, 2004).

Le cluster $[4\text{Fe-4S}]$ de ces enzymes est coordonné par trois cystéines, le quatrième ligand étant la SAM (S-AdénosylMéthionine).

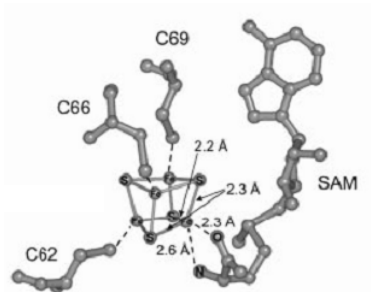


Figure 2 : Structure obtenue aux rayons X (2,07 Å) du site actif ($[\text{Fe-S}] + \text{SAM}$) de Hem N, une protéine de la famille radical-SAM (Layer *et al.*, 2005)

Ces deux cofacteurs (centre $[\text{Fe-S}]$ et SAM), communs à toutes ces enzymes, sont essentiels pour leur activité ; ils agissent conjointement pour générer une espèce radicalaire. Plus précisément, le centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ provoque la réductolyse de la SAM conduisant à la formation de méthionine et du radical 5'-déoxyadénosyle (Ado^\bullet), permettant l'activation des substrats à transformer.

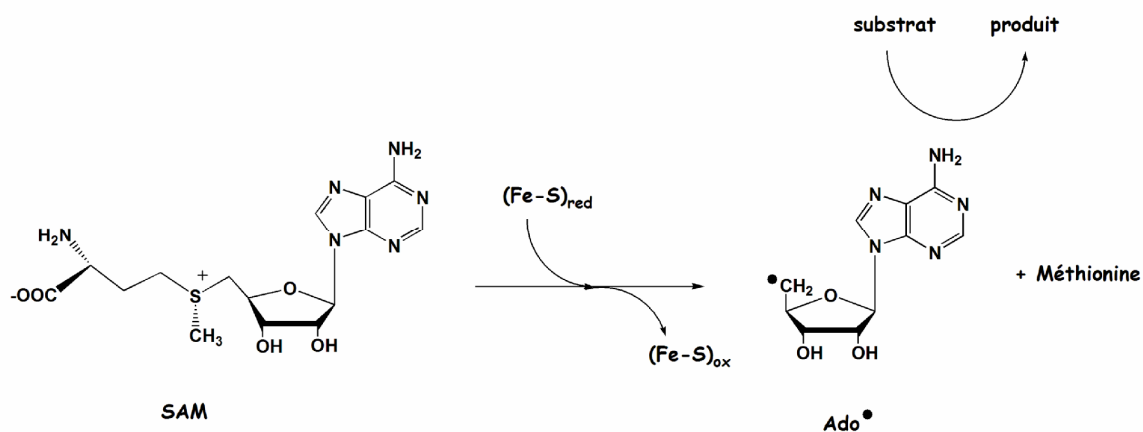


Figure 3 : Equation bilan de la réductolyse de la SAM

D'autres protéines $[\text{Fe-S}]$ peuvent être impliquées dans un processus rédox. C'est le cas de GcpE, enzyme impliquée dans la biosynthèse des isoprénoïdes. Son centre $[4\text{Fe-4S}]$ catalyse la réduction du substrat, le 2-C-méthyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate, via deux transferts consécutifs d'un électron accompagnant la réaction de déshydratation (Seemann *et al.*, 2005).

I-2-3- La régulation de gènes

De façon très intéressante, les centres [Fe-S] peuvent être sensibles aux conditions intra cellulaires et ainsi jouer un rôle clé dans la régulation de certains processus biologiques. Plusieurs régulateurs ont été décrits : chacun est sensible à un stimulus particulier et peut intervenir à deux niveaux : soit au niveau transcriptionnel, tel que la FNR, IscR ou SoxR, soit au niveau traductionnel, comme la protéine IRP chez les eucaryotes.

La FNR (Fumarate Nitrate Reduction) est un régulateur contrôlant l'expression de nombreux gènes dans des conditions d'anaérobiose (Kiley and Beinert, 2003). La forme active, se liant à l'ADN, est un dimère possédant un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ par sous unité. Ces centres sont nécessaires pour la dimérisation de la protéine et son activité. En présence d'oxygène, le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ se convertit rapidement en un centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ qui rend la protéine inactive, alors incapable de dimériser et de lier l'ADN. Récemment, il a été montré que des conditions de croissance aérobies pouvaient conduire à l'obtention de la forme apo de la FNR. Sous cette forme, la protéine n'est pas stable et est sujette à la protéolyse (Mettert and Kiley, 2005).

Il faut noter que la FNR est également un senseur de NO, celui-ci entraînant une dégradation du centre $[4\text{Fe-4S}]$ de la protéine (Cruz-Ramos *et al.*, 2002).

IscR est le répresseur de l'opéron *isc* impliqué dans la biosynthèse des centres [Fe-S] (Kiley and Beinert, 2003). Il est sensible à l'état des clusters [Fe-S] dans la cellule. En effet, lorsque le pool de centres [Fe-S] dans la cellule est suffisant et que toutes les protéines [Fe-S] sont actives, IscR est sous forme holo, contenant un centre $[2\text{Fe-2S}]$. Sous cette forme, IscR se lie à l'ADN et bloque sa propre transcription ainsi que celle de l'opéron *isc*. Dans le cas inverse (conditions de carence en centres [Fe-S]), IscR est sous forme apo et déréprime sa transcription et celle de l'opéron *isc*. Très récemment, il a été montré que IscR participait également à la régulation de l'opéron *suf* (Yeo *et al.*, 2006). De fait, IscR intervient dans l'activation de l'opéron *suf*, comme cela est détaillé dans le paragraphe II-4-3.

Le facteur de transcription SoxR joue un rôle de senseur dans le cadre du stress oxydant (stress superoxyde) et nitrosant (stress NO). Son centre $[2\text{Fe-2S}]$ passe de l'état d'oxydation +1 à +2 (dans le cas du stress superoxyde), ou bien se retrouve nitrosylé (dans le

cas du stress NO) (Kiley and Beinert, 2003). Dans ces conditions, la protéine est capable de stimuler (par 100) l'expression du facteur de transcription SoxS qui peut alors activer l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant (telles que la SuperOxyde Dismutase).

La protéine IRP1 (Iron Regulatory Protein 1) est un senseur du fer (Pantopoulos, 2004) mais également du stress oxydant et nitrosant (Pantopoulos and Hentze, 1995 ; Castro *et al.*, 1998). Elle existe sous deux formes ayant chacune une activité particulière : lorsque la protéine possède un centre [Fe-S], de type [4Fe-4S]), elle a une fonction aconitase alors que dans des cas de carence en fer, la protéine possède un centre de type [3Fe-4S] ou perd totalement son cofacteur et joue un rôle de régulateur. C'est également le cas en présence d'oxyde nitrique (NO) ou peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans ces conditions, la structure de la protéine est modifiée ; la protéine est alors capable de lier une région spécifique de l'ARNm, appelée IRE (Iron Responsive Element) codant pour des protéines impliquées dans l'utilisation, le stockage et l'export de fer (par cette interaction, la protéine IRP réprime par exemple la traduction de la ferritine, stockant le fer, mais stimule la synthèse des récepteurs de la transferrine, transportant et délivrant le fer).

D'autres protéines ont été proposées comme ayant un rôle de régulateur.

La ferrochélatase est une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'hème. Il a été proposé qu'elle soit un senseur de NO via son centre [2Fe-2S]. En effet, Dailey et coll. ont montré que l'activité de la ferrochélatase était fortement inhibée en présence d'oxyde nitrique, ce dernier provoquant la dégradation du centre [Fe-S] de la protéine (Sellers *et al.*, 1996).

La glutarédoxine 2 est une protéine connue pour contrôler l'équilibre redox intracellulaire chez les eucaryotes. Elle existe sous deux états dans la cellule : une forme monomérique ayant une activité catalytique et une forme dimérique inactive liant un centre [2Fe-2S] à l'interface, qui bloque le site actif de la protéine. Des études cristallographiques récentes ont montré que ce cluster peut être stabilisé par deux molécules de glutathion. Dans des conditions de stress oxydant, le dimère est instable ; la protéine existe majoritairement sous forme monomérique, active. Il a été proposé que la glutarédoxine 2 soit impliquée dans la réponse au stress oxydant en rétablissant par exemple l'état réduit des groupements thiols ayant subi des dommages oxydatifs (Johansson *et al.*, 2007).

Dernièrement, il a été proposé que la protéine WhiB3 soit un senseur d'oxygène et d'acide nitrique chez *M. tuberculosis* via son centre [Fe-S]. De fait, WhiB3 possède un centre

[4Fe-4S] qui est dégradé en présence d'oxygène, ou bien nitrosylé en présence de NO (Singh *et al.*, 2007). Ainsi, WhiB3 est sensible aux modifications de l'état rédox de la cellule et interviendrait dans la régulation de l'équilibre rédox de la cellule et le maintien de l'état de latence.

I-2-4- Le rôle structural

Jusqu'à présent, il était admis que certaines protéines [Fe-S] possèdent un cluster n'ayant aucune des fonctions citées ci-dessus, et servant simplement à structurer la chaîne polypeptidique, comme cela est déjà connu pour l'atome de zinc dans les protéines à doigt de zinc (Kuwahara and Coleman, 1990). Cette classe de protéines était représentée essentiellement par l'endonucléase III et MutY, impliquées toutes deux dans la réparation de l'ADN (Kuo *et al.*, 1992; Porello *et al.*, 1998). Cependant, des études récentes suggèrent que le cluster [4Fe-4S] de ces enzymes ne serve pas seulement à contrôler la structure de la protéine mais soit impliqué dans un processus rédox permettant la détection et la modification des bases de l'ADN endommagées (Yavin *et al.*, 2006). Il semble que le rôle structural des centres [Fe-S] soit une fonction physiologique qui tende à disparaître. On peut tout de même noter le cas de la glutamine 5-phosphoribosyle-1-pyrophosphate amidotransférase, enzyme impliquée dans la biosynthèse des purines, et contenant un centre [4Fe-4S] dont le rôle structural n'a toujours pas été remis en question. Il semblerait que ce cluster oriente spécifiquement la protéine pour une catalyse optimale (Vollmer *et al.*, 1983).

I-2-5- Le stockage du fer

Des polyferrédoxines ont été mises en évidence (chez les Archées uniquement). Elles contiennent jusqu'à 12 centres [4Fe-4S] et ont été proposées alors comme jouant un rôle de stockeur de fer (Hedderich *et al.*, 1992).

La description des centres [Fe-S] et de leurs fonctions biologiques souligne nettement toute l'importance qu'ils représentent dans le monde du vivant. C'est pourquoi, depuis quelques années, de nombreuses équipes de recherche dans le monde entier, s'intéressent à une problématique en amont, à savoir la biosynthèse des centres [Fe-S]. Notre laboratoire est un spécialiste dans le domaine en ce qui concerne le monde bactérien. Cette étude rentre dans le concept général de la maturation des métalloprotéines en biologie, illustré par le Tableau 3.

Ce concept, relativement récent, désigne l'acquisition, le transport et l'incorporation d'un métal (ou centre métallique) au sein d'une protéine cible. Ainsi, dans le cas des protéines [Fe-S], nous nous attachons à comprendre comment les atomes de fer et de soufre sont mobilisés, assemblés, puis incorporés au sein de protéines cibles afin de les rendre fonctionnelles. Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, ce processus implique des machineries protéiques complexes que nous allons détailler et dont certaines protéines ont fait l'objet de mon travail de thèse.

Centre métallique	Métalloprotéine maturée	Système de maturation
Cuivre	Superoxyde Dismutase NO réductase Oxydase Fet3 Cytochrome oxydase	Ccs Nos Ccc2 Cox17/Sco
Nickel	Hydrogénase (NiFe) Co deshydrogénase Uréase	Hyp, Hup Coo Ure
Molybdène	Enzymes Moco	Moe, MogA, Moa, Mob, Nar
Fer-Soufre	Nitrogénase Non spécifique : protéines à centre [2Fe-2S] et [4Fe-4S] Hydrogénase (Fe) Quinolate synthase	Nif Isc, Suf Hyd Csd

Tableau 3 : quelques métalloprotéines et système de maturation impliqué

II- La biosynthèse des centres [Fe-S]

II-1- Introduction

Aujourd'hui, il est communément admis que les centres [Fe-S] peuvent être assemblés de manière efficace *in vitro* dans de nombreuses apoprotéines par reconstitution chimique, à partir de fer ferreux Fe^{2+} et d'ions sulfures S^{2-} , dans des conditions anaérobies. Cependant, *in vivo*, la biosynthèse des centres [Fe-S] ne se produit pas spontanément. En effet, les quantités importantes de Fe^{2+} et S^{2-} requises pour une reconstitution chimique ne sont pas compatibles avec la toxicité de ces éléments, qui ne sont donc présents, sous forme libre, qu'à très faible concentration dans la cellule. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les atomes de fer et de soufre

sont assemblés en centre [Fe-S] *in vivo* par des protéines spécifiques a été beaucoup étudiée durant ces dix dernières années, et confortée avec la découverte de plusieurs systèmes protéiques d'assemblage.

Ces systèmes protéiques ont comme principales fonctions :

- la mobilisation des atomes de fer et de soufre de leurs sources de stockage respectives,
- l'assemblage sous forme de centre [Fe-S],
- le transfert à la protéine cible.

Toutes ces réactions doivent être parfaitement contrôlées de sorte que ni le fer ni le soufre ne soient libérés durant le processus.

La cellule contient en fait un nombre très limité de « machineries » de biosynthèse pour l'ensemble des différents centres [Fe-S]. On en trouve essentiellement deux chez les bactéries (ISC et SUF comme cela est décrit dans les pages suivantes). A la vue de cette stratégie hautement économique, on peut s'interroger sur la spécificité de ces systèmes. En clair, par quel mécanisme ces machineries décident-elles d'assembler tel ou tel type de centre ?

II-2- Les différentes machineries chez les procaryotes

II-2-1- Historique et description des différentes machineries

A ce jour, plusieurs systèmes de maturation des protéines [Fe-S] chez les bactéries ont été mis en évidence.

Dean et coll. ont été les pionniers dans ce domaine en étudiant la maturation de la nitrogénase chez *A. vinelandii*, bactérie fixatrice d'azote (Jacobson *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1993). Cette équipe a identifié plusieurs gènes, organisés sous forme d'opéron (appelé par la suite **opéron *nif*** pour **N**itrogen **F**ixation), et codant pour des protéines requises spécifiquement pour l'assemblage du centre [Fe-S] de la nitrogénase. Deux d'entre elles, NifS et NifU sont essentielles à l'activité de la nitrogénase. Des expériences de biologie moléculaire ont montré que l'inactivation des gènes *nifSU* entraînait une forte diminution mais pas une totale élimination de l'activité nitrogénase (Jacobson *et al.*, 1989). Cette observation clé suggérait l'existence d'autres gènes assurant un taux résiduel de nitrogénase

active et codant donc pour des protéines ayant des fonctions similaires à celles des protéines NifS et NifU. Ceci a conduit à la découverte, en 1998, du système ISC (Zheng *et al.*, 1998).

L'opéron *isc* (Iron Sulfur Cluster) est constitué de 8 gènes *iscRSUA-hscBA-fdx-yfhJ*. La suppression totale du système ISC (et en particulier la suppression de *iscS*) chez *E. coli* conduit à un phénotype particulier. On observe en effet, un ralentissement de la croissance des cellules en milieu riche mais aussi une forte diminution de l'activité des enzymes [Fe-S], activité réduite de plus de 90% par rapport à une souche sauvage (Schwartz *et al.*, 2000; Takahashi and Tokumoto, 2002; Tokumoto and Takahashi, 2001). Cette observation a mis en évidence le rôle prédominant du système ISC pour la maturation des protéines [Fe-S] chez *E. coli*, qui ne contient pas le système NIF. Cependant, l'existence d'une activité résiduelle laissait supposer qu'un système alternatif puisse intervenir dans la biosynthèse des centres [Fe-S] et ainsi prendre le relais du système ISC. Le système SUF a ainsi été mis en évidence (Takahashi and Tokumoto, 2002).

L'opéron *suf* (mobilization of SUIFur), constitué de 6 gènes (*sufABCDSE*), a d'abord été identifié chez *E. coli*. Les premières expériences semblaient montrer que la contribution de l'opéron *suf* dans la biosynthèse des centres [Fe-S] était mineure puisque la suppression des six gènes *sufABCDSE* n'avait que peu d'effet sur l'activité des enzymes [Fe-S] (Takahashi and Tokumoto, 2002). En fait, le rôle du système SUF devient prédominant dans des conditions de stress oxydant et de carence en fer (Nachin *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2004), comme cela est détaillé par la suite. Ainsi, le système SUF remplit un rôle similaire à celui du système ISC, mais intervient dans des conditions particulières (de stress oxydant et de carence en fer).

Très récemment, un troisième système, nommé CSD (Cystéine Sulfinatase Desulfinate), a été découvert chez *E. coli* (Loiseau *et al.*, 2005). Ce système est extrêmement simple comparé aux systèmes ISC et SUF puisqu'il ne se compose que de deux protéines, CsdA et CsdE. Il est possible qu'il fonctionne grâce à la contribution d'autres protéines appartenant aux systèmes ISC et/ou SUF ou de nature encore inconnue. Il a été mis en évidence comme donneur de soufre spécifique dans la maturation du centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase (nommée NadA), une enzyme impliquée dans la biosynthèse du NAD (Cicchillo *et al.*, 2005; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2005).

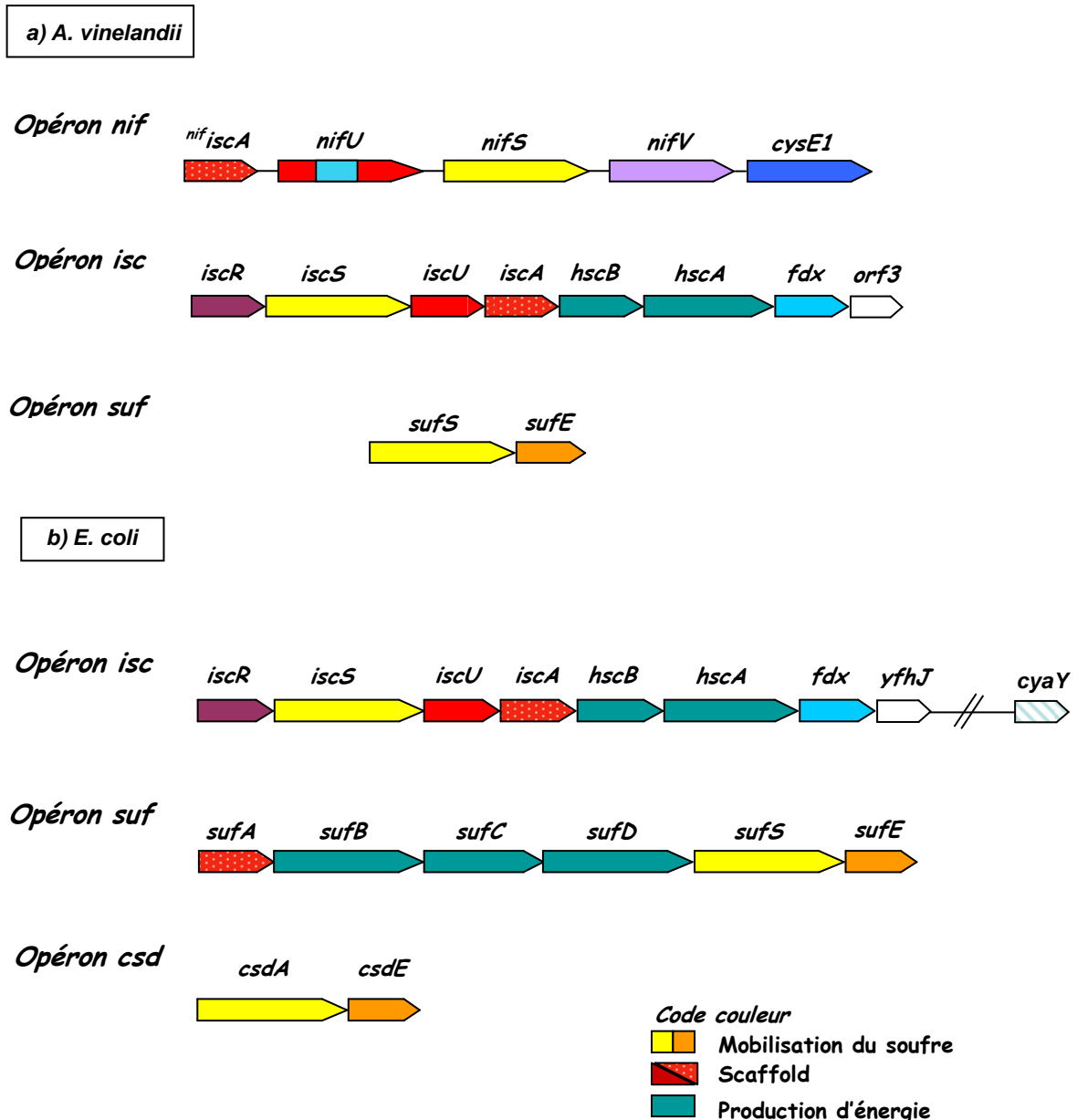


Figure 4 : Organisation des opérons *nif*, *isc*, *suf* et *csd* impliqués dans la biosynthèse des centres [Fe-S] chez *A. vinelandii* et *E. coli*

La figure 4, basée sur des études bioinformatiques et biochimiques, montre, par l'intermédiaire des codes couleurs, que les différents systèmes de maturation sont composés de gènes codant pour des protéines ayant des fonctions similaires.

Les donneurs de soufre

Ainsi, chaque système possède des protéines responsables de la mobilisation du soufre. La première à avoir été identifiée est la protéine NifS. Cette enzyme à Pyridoxal

Phosphate (PLP) est capable de convertir la L-cystéine en L-alanine et soufre (libéré sous forme de sulfure en présence de DTT), selon un mécanisme aujourd'hui bien connu (Zheng *et al.*, 1994) et qui sera présenté ultérieurement dans ce manuscrit. Le soufre est stocké sous la forme d'un persulfure au niveau d'une cystéine conservée ayant un caractère nucléophile fort (Cys325 chez *A. vinelandii*) et essentielle à l'activité. NifS appartient en fait à une classe de protéines définies comme ayant une activité cystéine désulfurase, dont font partie également IscS, SufS et CsdA. IscS présente une forte identité de séquence (40 %) avec NifS, en particulier au niveau du site actif constitué de la cystéine nucléophile et de la région liant le PLP. La structure de IscS d'*E. coli* a été résolue par cristallographie aux rayons X (Cupp-Vickery *et al.*, 2003). Elle révèle que le résidu cystéine catalytique (Cys328 chez *E. coli*) se trouve sur une boucle flexible, proche de la surface, mais à une distance importante (17 Å) du cofacteur PLP. Une analyse fine de la structure montre qu'un changement conformationnel est possible, amenant la cystéine proche du PLP. Les protéines SufS et CsdA présentent 24 % d'identité avec NifS. La structure cristallographique de SufS a été obtenue par diffraction des rayons X (Fujii *et al.*, 2000) et sera détaillée ultérieurement dans cette introduction. Des études cinétiques ont révélé que parmi toutes ces protéines, c'est CsdA qui possède la meilleure activité cystéine désulfurase (Mihara *et al.*, 2000). Pour terminer, il convient de noter que les protéines SufE et CsdE forment un complexe avec les protéines SufS et CsdA respectivement, et permettent d'augmenter l'activité cystéine désulfurase de ces dernières d'un facteur 50 et 2 respectivement (Loiseau *et al.*, 2003; Loiseau *et al.*, 2005).

Les protéines scaffold

Les machineries NIF, ISC et SUF possèdent également toutes trois des protéines d'échafaudage dites protéines « scaffold » (NifU, IscA^{nif}, IscU, IscA et SufA), capables d'assembler transitoirement des centres [Fe-S] avant de les transférer à des protéines cibles.

→ Les protéines de type U

NifU est une protéine homodimérique formant un complexe tétramérique avec NifS (Yuvaniyama *et al.*, 2000). Elle contient neuf cystéines conservées réparties sur trois domaines (figure 5). Le domaine N-terminal comporte trois cystéines conservées (Cys35, Cys62, Cys106) ; le domaine central contient quatre cystéines conservées (Cys137, Cys139, Cys172, Cys175) et enfin, le domaine C-terminal, dit domaine Nfu, contient deux cystéines conservées (Cys272, Cys275). Les domaines N-terminal et C-terminal peuvent lier, au niveau de leurs résidus cystéines, des centres [Fe-S] transitoires (de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S] pour le domaine N-terminal et uniquement de type [4Fe-4S] pour le domaine C-terminal) utilisés

pour la maturation de la nitrogénase et ont ainsi été caractérisés comme domaines « scaffold » (Smith *et al.*, 2005b). Johnson et coll. ont proposé que l'existence de deux domaines scaffold pouvait faciliter la formation et la distribution de deux centres [Fe-S] simultanément, permettant un assemblage optimal et rapide du cluster P de la nitrogénase. De plus, il n'est pas impossible que l'existence de ces deux domaines scaffold soit nécessaire pour subvenir aux besoins de la cellule dans des conditions physiologiques différentes encore indéterminées (Smith *et al.*, 2005b). Le domaine central coordine un centre [2Fe-2S] stable, non transférable à d'autres protéines (Agar *et al.*, 2000; Yuvaniyama *et al.*, 2000) et qui aurait plutôt un rôle rédox.

La protéine IscU est homologue à la partie amino-terminale de NifU (figure 5); elle contient également trois résidus cystéine conservés (Cys37, Cys63, Cys106 chez *E. coli*), organisés selon le même motif consensus caractérisant en fait les protéines scaffold dites de type U (CX_nCX_pC). Ces cystéines sont proposées comme étant les ligands de centres [Fe-S], ce qui a été mis en évidence *in vitro* par des expériences de mutagenèse dirigée sur la protéine IscU humaine hIscU (Foster *et al.*, 2000).

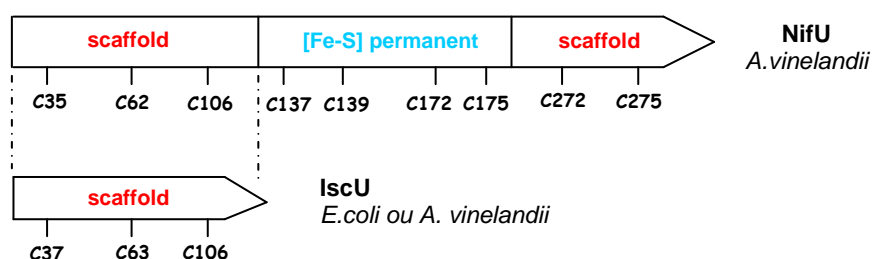


Figure 5 : représentation des trois domaines de NifU ; homologie avec IscU.

Il a été montré par plusieurs groupes de recherche que IscU forme un complexe covalent avec IscS (Kato *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005a). Ce complexe résulte de la formation d'un pont disulfure entre la cystéine catalytique (Cys328) de IscS et l'une des cystéines conservées de IscU : il s'agit de la cystéine Cys63 chez *E. coli* (Kato *et al.*, 2002) et de la cystéine Cys37 chez *A. vinelandii* (Smith *et al.*, 2005a). IscS est capable de transférer du soufre à IscU au niveau des cystéines conservées. Johnson et coll. ont récemment mis en évidence, par des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur IscU d'*A. vinelandii*, que ce transfert se produit même en absence d'un complexe entre les deux protéines IscS et IscU, cette dernière comportant une mutation au niveau de la cystéine Cys37 (C37A) (Smith *et al.*,

2005a). En ce qui concerne le centre [Fe-S] de IscU, des expériences *in vitro* ont montré que la protéine coordine un centre [2Fe-2S] par monomère. Ces centres peuvent être transférés à la ferrédoxine, cette étape étant stimulée par les protéines HscA et HscB décrites ci-après (Chandramouli and Johnson., 2006). Les centres [2Fe-2S] peuvent conduire, après réduction par la ferrédoxine, à la formation d'un centre [4Fe-4S] situé certainement à l'interface du dimère (Chandramouli *et al.*, 2007) (figure 6). Ce centre peut être transféré, quant à lui, à l'aconitase, une protéine [4Fe-4S] (Unciuleac *et al.*, 2007). L'étape de réduction des deux centres [2Fe-2S]²⁺ en un centre [4Fe-4S]²⁺ au sein de IscU est essentielle puisque seules les entités de type [4Fe-4S] peuvent être transférées à l'aconitase (Unciuleac *et al.*, 2007).

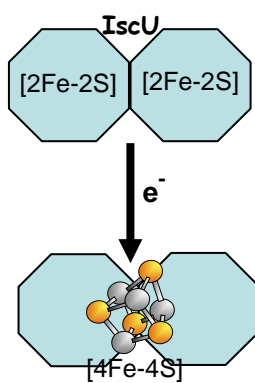


Figure 6 : représentation de l'assemblage des centres [Fe-S] au sein de IscU

→ Les protéines de type A

Les protéines de type A (IscA^{nif}, IscA et SufA) diffèrent des protéines de type U par la séquence en acides aminés contenant les cystéines conservées, le motif caractéristique étant CX₆₂₋₆₅CGC (figure 7). De même que pour IscU, ces cystéines sont proposées comme étant les ligands de centres [Fe-S] formés au sein de la protéine. Ce point sera plus amplement détaillé lors de la description de mes objectifs de thèse (paragraphe III). Ces trois protéines ont été montrées comme étant capables d'assembler des centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] et de les transférer à des protéines cibles de type [2Fe-2S] ou [4Fe-4S].

Très récemment, une autre protéine de type A a été caractérisée par Barras et coll. Il s'agit de la protéine ErpA (Essentiel Respiratory Protein A) (Loiseau *et al.*, 2007). La protéine ErpA d'*E. coli* présente 40 % d'identité avec IscA d'*E. coli* et 34 % d'identité avec SufA d'*E. coli* et contient donc également les trois résidus cystéines conservés organisés selon le motif CX₆₃CGC ; ces résidus ont été montrés comme étant essentiels à la fonction de la protéine *in vivo*. Des études réalisées *in vitro* ont permis de montrer que ErpA est capable d'assembler

des centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] après reconstitution chimique en conditions anaérobies, et de transférer ces centres [Fe-S] à la protéine IspG, une protéine [4Fe-4S], impliquée dans la biosynthèse des IPP (Isopentényl-diphosphates). Contrairement aux protéines SufA et IscA, ErpA est essentielle pour le métabolisme de la cellule. En effet, une souche d'*E. coli* mutée pour le gène *erpA* ne pousse pas en présence d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons. ErpA est essentielle pour la respiration aérobie et anaérobie. Il est intéressant de noter que ErpA ne fait partie d'aucune des machineries de biosynthèse identifiées à l'heure actuelle chez *E. coli*. On peut se demander alors si elle interagit avec l'une d'entre elle pour maturer des protéines [Fe-S] telles que IspG, ou bien si c'est un constituant d'un nouveau système de biosynthèse encore non identifié.



Erc.SufA	-MQTHDVETFSLDEQAWQG-----LTLTDS SA VAHISNLMGRDES VQ GIRLAVKQSG GCAG	53
Ec.SufA	-MDMHS-GTFNPQDFAWQG-----LTLTPA AA IHIRELVAKQPGMVGVR LGV KQT GCAG	52
St.SufA	-MEIHS-DTFNPEDFPWQG-----LTLTPA AA AHIRELAEKQPGMLGVRLSVKQT GCAG	52
Ec.IscA	-MS-----ITLSDS AA ARVNTFLANRCKGFGRLRGVRTSG GC SG	37
Av.IscA	-MA-----VTMT EA AAARHIRRSLDGRGKGEGIRLGVRTSG GC SG	37
Pa.IscA	-MA-----ISMTEA AA AKHVQRSLEGRGKGEGIRLGVRTT GC SG	37
		
Erc.SufA	FGYVLELVHQDPDS DR LYQREGARLFIPKAMPISD GT EVDFVQEGINQV FK FNNPKARH	113
Ec.SufA	FGYVLDSVSEPKDD DL LFEHDGAKLFVPIQAMPFI DG TEVDFVREGLNQI FK FHNPKAQN	112
St.SufA	FGYVLDTVREPKDD DL VFEAEAGAKLFAPLQAMPFI DG TEVDYVQEGLNQ LF KFHNPKAQN	112
Ec.IscA	MAYVLEFVDEPTPE DI VFEDKGKVVVDGKSLQFLD GT QLDFVKEGLNEG FK FNTNPNVKD	97
Av.IscA	LAYVLEFVDEVASE DQ VFESHGKVIIDPKSLVYLD GT ELDFVREGLNEG FK FNNPNVRG	97
Pa.IscA	LAYVLEFVDELA AE DLVFESHGKVIIDPKSLVYLD GT ELDFVREGLNEG FK FNNPNVRG	97
Erc.SufA	AC GC GSFGL-----	123
Ec.SufA	EC GC GESFGV-----	122
St.SufA	EC GC GESFGV-----	122
Ec.IscA	EC GC GESFHV-----	107
Av.IscA	EC GC GESFNI-----	107
Pa.IscA	EC GC GESFNV-----	107
		

Figure 7 : Alignement de séquences de protéines homologues de type A

Erc : *Erwinia chrysanthemi* ; Ec : *Escherichia coli* ; St : *Salmonella typhonium* ; Av : *Azotobacter vinelandii* ; Pa : *Pseudomonas aeruginosa*

Aujourd'hui, la fonction exacte des protéines de type A n'est pas clairement établi. De fait, les différentes hypothèses émises par plusieurs groupes de recherche ne font pas l'unanimité. Initialement, il a été proposé que les protéines de type A soient des **protéines scaffold** (Krebs *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003; Wollenberg *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002a). Ceci sera plus amplement détaillé ultérieurement, avec la description de SufA (cf II-4-4-c). Dans ce contexte, il peut être intéressant de noter que IscU est capable de transférer son centre [Fe-S] à IscA, alors que le processus inverse est impossible (Ollagnier-de-Choudens *et al.*,

2004). Ceci a conduit à l'hypothèse que IscA intervient comme une usine d'assemblage secondaire ou spécifique, par laquelle les centres [Fe-S], préassemblés au sein de IscU, peuvent transiter avant d'être transférés à des protéines cibles. D'autre part, on peut noter que récemment, il a été montré que des quantités catalytiques de protéine scaffold (IscA ou IscU) suffisait à la maturation d'une protéine cible (dans ce cas, la ferrédoxine) (Bonomi *et al.*, 2005). Il a également été proposé que les protéines de type A puissent intervenir en tant que **donneur de fer** (voir paragraphe suivant) (Ding and Clark, 2004), ou alors en tant que **régulateur**. En effet, des expériences réalisées sur *Synechocystis* ont conduit Golbeck et coll. à proposer que les protéines de type A (IscA/SufA) soient des protéines [Fe-S] jouant un rôle de régulateur dans l'homéostasie du fer et dans la réponse au stress oxydant (Balasubramanian *et al.*, 2006).

→ Les protéines de type Nfu

Une troisième classe de protéines scaffold est apparue récemment : il s'agit des protéines de type Nfu, dont le prototype est le domaine C-terminal de la protéine NifU (présenté précédemment p.29-30). Elles possèdent deux résidus cystéines conservés organisés selon le motif CX₂C et caractérisés comme étant les ligands de centres [Fe-S] transitoires. La nature exacte de ces clusters n'est pas claire puisque la protéine Nfu humaine a été montrée comme liant un centre de type [4Fe-4S] par dimère (Tong *et al.*, 2003) alors que chez *A. thaliana*, un centre de type [2Fe-2S] situé à l'interface de deux monomères a été mis en évidence (Yabe *et al.*, 2004).

Les protéines annexes

Les différents systèmes de maturation possèdent d'autres protéines que les cystéines désulfurases ou les protéines « scaffold » dont le rôle exact dans la biosynthèse des centres [Fe-S] reste imprécis encore aujourd'hui.

Les protéines HscA, HscB, présentes dans le système ISC, ont été caractérisées comme des protéines chaperones. Des expériences de génétique ont montré l'importance de ces deux protéines : de fait, chez *E. coli*, l'inactivation des gènes *hscA* ou *hscB* lors de la coexpression de l'opéron *isc* avec un plasmide codant pour une ferrédoxine conduit à une diminution de la surexpression de cette dernière (plus de 50 % dans le cas de *hscA* et 25 % dans le cas de *hscB*), montrant que ces gènes sont importants pour la maturation de protéines [Fe-S] (Takahashi and Nakamura, 1999). D'autre part, les gènes *hscBA* sont essentiels pour la croissance des cellules d'*A. vinelandii* (Johnson *et al.*, 2006). D'un point de vue biochimique,

il a été montré que les deux protéines HscA et HscB interagissent entre elles, ainsi qu'avec la protéine IscU (Hoff *et al.*, 2000). Le motif d'interaction de cette dernière avec HscA a été identifié : il s'agit du motif LPPVK localisé près du troisième résidu cystéine largement conservé (Hoff *et al.*, 2003). La protéine HscA possède une activité ATPase, très fortement stimulée (plus de 400 fois) par l'interaction avec HscB et IscU (Silberg *et al.*, 2001). Plusieurs hypothèses ont été faites concernant le rôle de ces protéines chaperones dans le processus de biosynthèse des centres [Fe-S]. Aujourd'hui, il semble admis que HscA/HscB aident au transfert du cluster de IscU à la ferrédoxine contenant un centre [2Fe-2S] (Chandramouli and Johnson, 2006) selon un mécanisme ATP dépendant. De fait, le transfert du cluster est stimulé (par 20) en présence de HscA/HscB (Chandramouli and Johnson, 2006).

La ferrédoxine, codée par le gène *fdx* de l'opéron *isc*, possède un centre [2Fe-2S] stable, du même type que celui coordonné par le domaine central de NifU et pouvant jouer un rôle rédox dans la biosynthèse des centres [Fe-S] (Ta and Vickery, 1992). Comme déjà mentionné, Johnson et coll. ont tout récemment montré, *in vitro*, que, en effet, la ferrédoxine était capable de réduire efficacement les deux centres [2Fe-2S] de IscU pour conduire à la formation d'un centre [4Fe-4S] (Chandramouli *et al.*, 2007). Une souche mutée pour le gène *fdx* de l'opéron *isc* présente un phénotype particulier. Chez *E. coli*, l'inactivation du gène *fdx* lors de la coexpression de l'opéron *isc* avec un plasmide codant pour une ferrédoxine conduit à une diminution (plus de 50 %) de la surexpression de cette ferrédoxine (Takahashi and Nakamura, 1999), ce qui montre l'importance du gène *fdx* de l'opéron *isc* pour la maturation de protéines [Fe-S]. Chez *A. vinelandii*, le gène *fdx* de l'opéron *isc* a été montré comme essentiel pour la croissance des cellules (Johnson *et al.*, 2006).

Le gène *yfhJ* code pour une petite protéine de 66 acides aminés dont la fonction n'a pas encore été clairement montrée (Takahashi and Nakamura, 1999). De récentes études ont révélé que la protéine YfhJ est capable de lier du fer (Pastore *et al.*, 2006). La protéine IscR est le régulateur de l'opéron *isc*, comme cela a préalablement été décrit (cf I-2-3) (Kiley and Beinert, 2003).

Les protéines SufB, SufC et SufD présentes dans le système SUF forment un complexe ayant une activité ATPase portée par SufC (Nachin *et al.*, 2003). Son rôle dans le processus de biosynthèse des centres [Fe-S] reste indéterminé. Je reviendrai en détail sur les études menées sur ce complexe dans les pages suivantes.

Le donneur de fer

Aucun des gènes des différents opérons ne code pour une protéine capable de stocker et délivrer du fer. Ainsi, lors de mon arrivée au laboratoire, la découverte d'une protéine ayant cette fonction constituait un véritable challenge, ce qui est toujours d'actualité.

Aujourd'hui, il est proposé que le donneur physiologique de fer chez les cellules eucaryotes est la **frataxine**. C'est aussi la protéine impliquée dans la pathologie de l'ataxie de Friedreich (Pandolfo, 2006). Il a été montré, *in vivo*, que la frataxine était nécessaire pour le maintien de l'homéostasie du fer (Cavadini *et al.*, 2000), ainsi que pour le maintien des enzymes à centres [Fe-S] et à fer héminique (Stehling *et al.*, 2004), et qu'elle interagissait avec des protéines impliquées dans le processus de biosynthèse des centres [Fe-S] telles que Nfs1 et Isu (protéines homologues de IscS et IscU respectivement) (Gerber *et al.*, 2003). D'autre part, des expériences réalisées *in vitro* ont révélé que la frataxine, capable de stocker 6 à 7 atomes de fer, pouvait transférer ces atomes à la protéine Isu pour l'assemblage de centres [Fe-S] (Yoon and Cowan, 2003).

En revanche, chez la bactérie, le donneur physiologique de fer n'a toujours pas été clairement identifié. Un homologue bactérien de la frataxine (25 % d'identité) a récemment été mis en évidence : il s'agit de la **protéine CyaY**. Cette protéine peut fixer du fer ferreux ($K_{\text{ass(Fe(II))}} = 2,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) et du fer ferrique ($K_{\text{ass(Fe(III))}} > 1 \cdot 10^{17} \text{ M}^{-1}$) (Bou-Abdallah *et al.*, 2004; Layer *et al.*, 2006). La résolution de la structure de la protéine par RMN révèle que les atomes de fer, quelque soit leur degré d'oxydation, sont localisés sur la protéine au niveau des mêmes régions (Nair *et al.*, 2004). De plus, des études menées au laboratoire durant ma thèse ont montré que CyaY d'*E. coli* était capable de fixer du fer ferrique dans des proportions variables suivant l'état d'oligomérisation de la protéine (le monomère ne fixe pas de fer alors que des formes d'oligomérisation supérieure dites « intermédiaires » (dimères à pentamères) fixent environ 20 atomes de fer ferrique par chaîne polypeptidique) et que ces atomes étaient ensuite mobilisables pour la formation de centres [Fe-S] au sein de IscU, en présence de la protéine IscS et de cystéine (Layer *et al.*, 2006). Ces résultats ont donc permis de caractériser CyaY comme un potentiel donneur de fer chez la bactérie. Cette conclusion a été confirmée par des expériences réalisées *in vivo* montrant que l'expression de CyaY, dirigée dans la mitochondrie, peut compléter une souche de levure délétée au niveau du gène de la frataxine, conduisant à une activité normale des enzymes [Fe-S] (Bedeckovics T, non publié). Le rôle de la protéine CyaY n'a pas pu être mis en évidence pendant longtemps chez la bactérie, ceci étant dû au fait qu'une souche mutée pour le gène *cyaY* ne présente pas de phénotype particulier (au niveau du métabolisme du fer ou des enzymes [Fe-S]), que ce soit

dans des conditions normales de croissance (Li *et al.*, 1999) ou dans des conditions de stress telles que la carence en fer et le stress oxydant (Barras *et al.*, résultats non publiés), suggérant l'existence d'autres protéines ayant la même fonction physiologique.

Chez *S. enterica*, la protéine YggX a été identifiée et caractérisée comme intervenant dans l'homéostasie du fer et dans le métabolisme des centres [Fe-S] (Gralnick and Downs, 2003). Une mutation du gène *yggX* conduit à une perturbation du métabolisme des centres [Fe-S] et de l'homéostasie du fer, ainsi qu'à une hypersensibilité au stress oxydant (Skovran *et al.*, 2004). La double mutation au niveau des gènes *yggX* et *cyaY* affecte de manière encore plus importante le métabolisme des centres [Fe-S] (Vivas *et al.*, 2006), ce qui suggère que ces deux protéines travaillent conjointement dans le métabolisme des centres [Fe-S]. Il est important de souligner que la structure de YggX a été obtenue par RMN par différentes équipes : Gehring et coll. montrent que dans leurs conditions d'expériences, YggX ne fixe pas de fer (Osborne *et al.*, 2005) ; Downs et coll. montrent, quant à eux, que YggX fixe du fer(II) mais faiblement ($K_d = 20 \mu\text{M}$) et que la structure tridimensionnelle n'est alors pas modifiée (Cui *et al.*, 2006). Ainsi, le rôle de YggX et la signification physiologique de la fixation du fer sur la protéine restent à préciser.

Enfin, il convient de noter qu'en 2004, au début de ma thèse, Ding et coll. ont montré que la protéine IscA avait la capacité de fixer du fer, *in vitro*, dans des conditions particulières, et ont donc proposé que IscA soit un donneur de fer dans la biosynthèse des centres [Fe-S] (Ding and Clark, 2004; Ding *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2005b). D'autre part, en se basant sur des études *in vitro*, par spectrométrie de masse et dosages colorimétriques, Ding et coll. ont également montré, récemment, que IscA lie fortement le fer ($K = 2 \cdot 10^{19} \text{ M}^{-1}$) dans des conditions normales de croissance, mais perd sa capacité à fixer du fer en présence de H_2O_2 (conditions assimilées à un stress oxydant). En revanche, CyaY stocke le fer dans ces mêmes conditions (présence de H_2O_2). Ceci a conduit Ding et coll. à proposer que IscA soit le donneur de fer dans des conditions normales de croissance et CyaY, dans des conditions de stress oxydant, limitant ainsi la présence de radicaux libres et les dommages oxydatifs (Ding *et al.*, 2007).

En résumé, il faut retenir que, chez les cellules eucaryotes, il est relativement admis que le donneur de fer est la frataxine. C'est tout du moins le seul donneur de fer potentiel identifié. Chez les cellules procaryotes, il a été montré clairement que la protéine CyaY pouvait jouer le rôle de donneur de fer mais il existe probablement d'autres protéines ayant la même fonction physiologique et pouvant prendre le relais de CyaY.

La figure 8 résume l'ensemble des connaissances acquises pour les différents systèmes bactériens ; elle schématise le fonctionnement général du processus de maturation des protéines [Fe-S]. A chaque fonction clé sont associées les protéines caractérisées dans les différents opérons chez les bactéries.

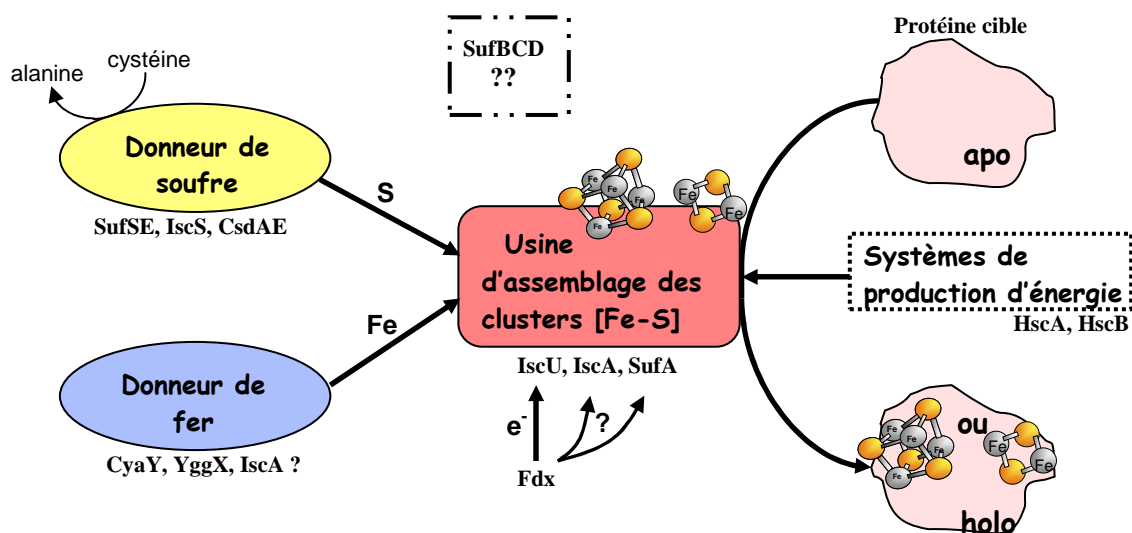


Figure 8 : schéma général de la biosynthèse des centres [Fe-S]

II-2-2- Distribution des systèmes de maturation des protéines [Fe-S] chez les organismes procaryotes

Comme nous venons de le voir, il existe plusieurs systèmes de maturation des protéines [Fe-S] chez les bactéries pouvant jouer des fonctions similaires. Chez certains organismes, plusieurs systèmes coexistent. Les cellules d'*E. coli* disposent par exemple des deux machineries principales ISC et SUF (Takahashi and Tokumoto, 2002; Tokumoto and Takahashi, 2001) ; ISC étant le système général de maturation intervenant dans des conditions normales de croissance et SUF étant un système intervenant dans des conditions particulières de croissance que sont la carence en fer et le stress oxydant. En revanche, on remarque que certaines bactéries ne possèdent qu'une seule machinerie. C'est le cas des organismes *T. maritima* ou encore *M. tuberculosis*, pour lesquels seul le système SUF est présent (Huet *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005).

Organismes	Systèmes de maturation présents
<i>Escherichia coli</i>	<i>sufABCDSE</i> <i>iscRSUA-hscBA-fdx-yfhJ</i>
<i>Azotobacter vinelandii</i>	<i>nifAUS</i> <i>iscRSUA-hscBA-fdx-orf3</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>nifSU</i> <i>iscS</i>
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>sufCBDSU</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>sufCBDSU</i>
<i>Methanococcus jannashii</i>	<i>sufBC</i>
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	<i>sufBCD</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>sufBDCSU</i>
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>sufBDCSU</i>
<i>Treponema palidum</i>	<i>sufBDCSU</i>

Tableau 4 : Distribution des gènes impliqués dans la biosynthèse des centres [Fe-S] chez différents organismes procaryotes

Il est intéressant de remarquer que chez *M. jannashii*, seul le système SUF est présent et il ne contient que les gènes *sufBC* ; la participation d'autres protéines (telle que la cystéine désulfurase MJ1678, homologue à IscS) est donc très certainement requise pour assurer l'ensemble du processus de maturation des protéines [Fe-S] chez cet organisme, qui ne contient pas non plus de protéine scaffold. Peut-être que SufB joue alors ce rôle chez *M. jannashii*. De plus, chez plusieurs organismes tels que *T. maritima*, la protéine SufA a été remplacée par la protéine SufU. Cette dernière, proposée également comme étant une protéine scaffold, présente une homologie de séquence en acides aminés avec IscU et non pas avec IscA. Cependant, il existe une différence au niveau du motif caractéristique de liaison à HscA, que SufU ne possède pas (Mansy *et al.*, 2004).

II-3- La maturation des protéines [Fe-S] chez les organismes eucaryotes

L'étude de la biosynthèse des centres [Fe-S] chez les cellules eucaryotes a débuté en 1998 avec les travaux de l'équipe de V. Culotta qui ont permis de mettre en évidence les premiers homologues de la machinerie ISC chez la levure (Strain *et al.*, 1998). Culotta et coll. recherchaient les éléments de la levure qui contribuaient au dommage oxydatif d'une souche déficiente pour la SuperOxyde Dismutase 1 (SOD1). Pour étudier la question, des souches mutantes capables de diminuer la source du stress oxydatif associé à la perte de la SOD1 ont été isolées. Les gènes mutés (trois gènes) ont été identifiés comme étant homologues à des gènes de l'opéron *isc* d'*E. coli* et pouvant donc participer à la maturation des protéines [Fe-S]

chez la levure (Strain *et al.*, 1998). Par la suite, d'autres protéines, situées dans la mitochondrie, homologues aux protéines Isc présentes chez la bactérie, ont été découvertes chez la levure *S. cerevisiae*. Ceci suggérait d'ores et déjà qu'il existe des similitudes concernant les processus d'assemblage des clusters et que l'importance des protéines [Fe-S] a été conservée. En fait, la machinerie d'assemblage ISC des mitochondries des cellules eucaryotes peut être considérée comme un héritage de la cellule bactérienne. Cependant, beaucoup d'autres protéines, non présentes chez la bactérie, sont également impliquées dans le processus de biosynthèse des centres [Fe-S] chez les eucaryotes. Les phénotypes associés à toutes ces protéines soulignent leur importance dans le processus de biosynthèse des centres [Fe-S] puisque l'inactivation des gènes correspondant conduit toujours à une diminution de l'activité des protéines [Fe-S].

Chez les eucaryotes, des protéines [Fe-S] sont présentes dans les mitochondries, dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau des cellules. Il a été montré, en prenant comme modèle d'étude la levure *S. cerevisiae*, que trois systèmes distincts, mais pas indépendants, participent à la maturation de ces différentes protéines [Fe-S]. La machinerie d'assemblage mitochondriale ISC est nécessaire à la maturation de toutes les protéines [Fe-S] présentes dans la cellule. La formation des protéines [Fe-S] cytoplasmiques et nucléaires requiert la participation de deux systèmes supplémentaires : le système d'exportation ISC et la machinerie CIA (Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly). Ces trois systèmes sont largement conservés chez les eucaryotes et sont aussi présents chez l'homme. Chaque système est détaillé ci-après, en prenant l'exemple de la levure *S. cerevisiae*. L'ensemble est représenté figure 9 (Lill and Mühlenhoff, 2005; Lill *et al.*, 2006; Lill and Mühlenhoff, 2006).

♦ La machinerie d'assemblage mitochondriale ISC :

Ce système compte 14 protéines. On y retrouve notamment les homologues de toutes les protéines codées par l'opéron *isc* chez la bactérie. Cette grande similarité suggère d'ores et déjà l'existence de mécanismes de biosynthèse des centres [Fe-S] comparables chez la bactérie et dans les mitochondries des cellules eucaryotes.

La protéine Nfs1 possède une activité cystéine désulfurase et est donc responsable de la mobilisation du soufre dans la mitochondrie (Muhlenhoff *et al.*, 2004). Par homologie avec le système bactérien, il est proposé qu'elle assure le transfert de soufre à la protéine scaffold Isu1, selon une réaction de transpersulfuration. Récemment, il a été découvert que cette étape

nécessitait la participation d'une autre protéine, Isd11 (Wiedemann *et al.*, 2006). Celle-ci forme un complexe avec Nfs1, stabilisant cette dernière, sujette à s'agréger.

On peut noter qu'une isoforme de la protéine Nfs1 a également été localisée dans le noyau. Sa présence dans le noyau est essentielle à la survie de la levure (Nakai *et al.*, 2001). De fait, la protéine Nfs1 possède une séquence d'adressage au noyau, nommée NLS, essentielle pour la levure. Lorsque cette séquence n'est pas fonctionnelle, aucun déficit au niveau des protéines [Fe-S] n'est observé, ce qui suggère que Nfs1, dans le noyau, possède un rôle dans d'autres métabolismes que celui de la biosynthèse des protéines [Fe-S], comme par exemple, dans la modification des ARN de transfert (Nakai *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2007).

Plusieurs protéines scaffold ont été identifiées : Isa1 et Isa2, Isu1 et Isu2 (Garland *et al.*, 1999; Kaut *et al.*, 2000). Elles contiennent toutes trois résidus cystéines conservés (organisés selon les motifs consensus des protéines de type A et de type U respectivement) qui sont de potentiels ligands d'un cluster [Fe-S]. Ceux-ci ont été montrés *in vivo* comme étant essentiels à l'activité des protéines Isa1 et Isa2 (Jensen and Culotta, 2000). Plusieurs expériences ont mis en évidence l'importance de toutes ces protéines scaffold. En effet, la double délétion des gènes *isu1* et *isu2* est létale pour la cellule (Mühlenhoff *et al.*, 2003a). Une mutation simple (pour l'un des gènes *isu1* ou *isu2*) entraîne une augmentation du fer dans la mitochondrie et une forte diminution de l'activité des protéines [Fe-S] (Garland *et al.*, 1999). Dans le cas des protéines de type A, il a été observé que la délétion d'un gène *isa1* ou *isa2* provoque une perte de l'ADN mitochondrial, une augmentation du fer dans la mitochondrie, ainsi qu'une diminution de l'activité de protéines [Fe-S] mitochondriales (telles que l'aconitase ou la succinate déshydrogénase) et cytoplasmiques (telle que l'isopropylmalate isomérase) (Jensen and Culotta, 2000). Les protéines Isa1 et Isa2 sont donc importantes pour la maturation des protéines [Fe-S] mitochondriales et cytoplasmiques. Toutefois, la double délétion des gènes *isa1* et *isa2* ne conduit pas à un phénotype plus marqué, montrant que les protéines de type A ne sont pas essentielles pour la cellule (Pelzer *et al.*, 2000).

Un système de protéines chaperones a également été mis en évidence. Il est constitué des protéines Ssq1, Jac1 et du « nucleotide exchange factor » Mge1 (Strain *et al.*, 1998). Les protéines Ssq1 et Jac1 sont homologues aux protéines HscA/HscB identifiées chez la bactérie. Il a d'ailleurs été montré, comme chez la bactérie, que Ssq1p forme un complexe avec la protéine Isu1 (Dutkiewicz *et al.*, 2004). Muhlenhoff et coll. ont observé que l'inactivation des gènes *ssq1*, *jac1* ou *Mge1* entraînait une augmentation (x5) de la quantité de centres [Fe-S]

assemblés au sein de Isu1p, suggérant que les protéines correspondantes interviennent après l'étape de formation du cluster dans Isu1p. De fait, il est proposé que ce système de protéines chaperones intervienne lors du transfert des centres [Fe-S] des protéines scaffold aux protéines cibles (Mühlenhoff *et al.*, 2003a).

La source de fer est proposée comme étant la frataxine codée, chez la levure, par le gène *yfh1* (Yeast Frataxine Homologue) (Chen *et al.*, 2002; Yoon and Cowan, 2003). Une mutation au niveau de ce gène n'est pas létale pour la levure *S. cerevisiae*. En revanche, la délétion du gène provoque une sensibilité accrue des cellules au stress oxydant, une augmentation du fer dans la mitochondrie, une perte du génome mitochondrial et une diminution de l'activité des protéines [Fe-S] (Chen *et al.*, 2002), identifiée d'ailleurs comme étant la conséquence première de la délétion du gène (Mühlenhoff *et al.*, 2002). L'implication de la protéine Yfh1 dans la biosynthèse des centres [Fe-S] a également été mise en évidence par des expériences *in vitro*. En effet, Yfh1p forme un complexe avec Isu1p et Nfs1p et l'interaction entre Yfh1p et Isu1p est renforcée en présence de fer (Gerber *et al.*, 2003). D'autre part, on peut noter qu'un rôle de chaperone à fer, délivrant des atomes de fer pour la biosynthèse de l'hème, ou prévenant une accumulation du fer dans la cellule a aussi été proposé pour la protéine Yfh1 (Babcock *et al.*, 1997; Lesuisse *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003).

Deux transporteurs membranaires, Mrs3 et Mrs4 ont été découverts : ils facilitent le transport du fer à travers la membrane mitochondriale (Mühlenhoff *et al.*, 2003b). Il a été montré qu'une mutation au niveau des gènes *mrs3* et *mrs4* entraîne une diminution de l'activité des protéines [Fe-S] (Zhang *et al.*, 2006).

D'autres protéines dont le rôle exact n'est pas connu ont été identifiées comme impliquées dans la biosynthèse des centres [Fe-S] : la protéine Yah1 (Yeast Adrenodoxine Homologue) est une ferrédoxine possédant un centre [2Fe-2S] et présente une identité de séquence avec la ferrédoxine de l'opéron *isc* chez *E. coli* (Lange *et al.*, 2000) ; la protéine Arh1 (Adrenodoxine Reductase Homologue) est une ferrédoxine réductase (Li *et al.*, 2001) servant probablement à réduire le centre [2Fe-2S] de Yah1 ; Grx5 est une glutarédoxine monothiol (Rodriguez-Manzanque *et al.*, 2002) ; enfin la protéine Nfu1 présente une forte homologie de séquence avec le domaine C-terminal de NifU et coordine un centre [4Fe-4S] *in vitro* (Schilke *et al.*, 1999).

◆ La machinerie d'exportation ISC

Celle-ci est constituée de 3 protéines. Atm1p est un transporteur mitochondrial de type ABC, ayant une activité ATPase (Kispal *et al.*, 1999), ce qui en fait un bon candidat pour exporter des molécules de la mitochondrie vers le cytoplasme. En fait, il a été observé que l'activité ATPase de Atm1p est stimulée (de 3 à 5 fois) en présence de composés thiolés. Il a donc été proposé que Atm1p exporte des molécules thiolées (Kuhnke *et al.*, 2006). La protéine Erv1 est située dans l'espace intermembranaire et possède une activité sulfhydryl oxydase *in vitro* (Lange *et al.*, 2001). Le glutathion GSH intervient dans l'équilibre rédox chez la levure et a été montré comme étant nécessaire à l'assemblage des centres [Fe-S] dans le cytoplasme (Sipos *et al.*, 2002). Les rôles précis de ces protéines et les mécanismes moléculaires mis en jeu sont encore largement inconnus.

◆ La machinerie d'assemblage cytoplasmique (Cytosolic Iron-sulfur cluster Assembly : CIA)

Quatre protéines ont été identifiées à ce jour comme faisant partie de cette machinerie. Les protéines Cfd1 et Nbp35 sont deux NTPases possédant chacune 4 cystéines conservées en C-terminal (Hausmann *et al.*, 2005). Deux de ces cystéines ont été montrées comme étant essentielles à la fonction de ces protéines et à la viabilité de la cellule (Roy *et al.*, 2003). La reconstitution chimique *in vitro* conduit à l'obtention de protéines [Fe-S] pour Cfd1 et Nbp35 (Netz *et al.*, 2007). Ces clusters sont labiles, d'où la proposition que ces deux protéines soient des « scaffold ». La protéine Nar1 contient deux centres [Fe-S] et présente une homologie avec les hydrogénases à fer (Balk *et al.*, 2005b). La dernière protéine identifiée est nommée Cia1. Elle est importante pour la maturation des protéines cibles mais pas des trois protéines détaillées précédemment, ce qui suggère qu'elle intervienne après les protéines Cfd1, Nbp35 et Nar1 dans le processus de biosynthèse des centres [FeS] dans le cytoplasme et le noyau (Balk *et al.*, 2005a). Son rôle exact n'est pas connu, tout comme celui de Nar1.

Il est important de rappeler que les trois systèmes décrits ne sont pas indépendants. En effet, comme cela a déjà été mentionné, les trois machineries sont nécessaires à la maturation des protéines cytoplasmiques et nucléaires. La machinerie CIA ne possède pas (à ce jour) de propres donneurs de fer et de soufre et requiert la participation de la machinerie d'assemblage mitochondriale.

Le tableau suivant regroupe toutes les protéines citées ci-dessus et impliquées dans la biosynthèse des centres [Fe-S] chez la levure et leur fonction probable. Il permet une comparaison rapide avec le système bactérien (de type *E. coli*).

Nom	Homologues bactériens	Fonction des protéines eucaryotes
Nfs1	IscS, SufS	Activité cystéine désulfurase , donneur de soufre
Isd11	-	Requise pour le transfert de soufre à Isu1
Isu1, Isu2	IscU	Scaffold : assemblage transitoire des clusters
Isa1, Isa2	IscA, SufA	Scaffold : assemblage transitoire des clusters
Yfh1	CyaY	Potentiel donneur de fer
Yah1	Fdx	Ferrédoxine : donneur potentiel d'électrons
Arh1	?	Ferrédoxine réductase ; transfert d'électrons du NADH vers Yah1
Ssq1	HscA	Chaperone
Jac1	HscB	Co-chaperone
Mge1	GrpE*	Echange ATP/ADP dans Ssq1
Grx5	Grx4	Inconnue
Nfu1	Domaine C-terminal de NifU	Inconnue
Atm1	-	Transporteur ABC ; exportation de composés de la mitochondrie vers le cytosol.
Erv1	-	Sulphydryl oxidase
GSH	?	Inconnue
Cfd1	ApbC*	Scaffold ?
Nbp35	-	Scaffold ?
Nar1	Hydrogénase à fer*	Inconnue
Cia1	-	Inconnue

Tableau 5 : rôles et homologues bactériens des protéines impliquées dans la biosynthèse des centres [Fe-S] chez les eucaryotes. Les protéines marquées par * ne font pas partie des opérons intervenant dans la biosynthèse des centres [Fe-S] chez la bactérie. « - » : protéines n'ayant pas d'homologue chez la bactérie.

La figure 9 schématise le fonctionnement général de la biosynthèse des centres [Fe-S] chez les cellules eucaryotes (exemple de la levure).

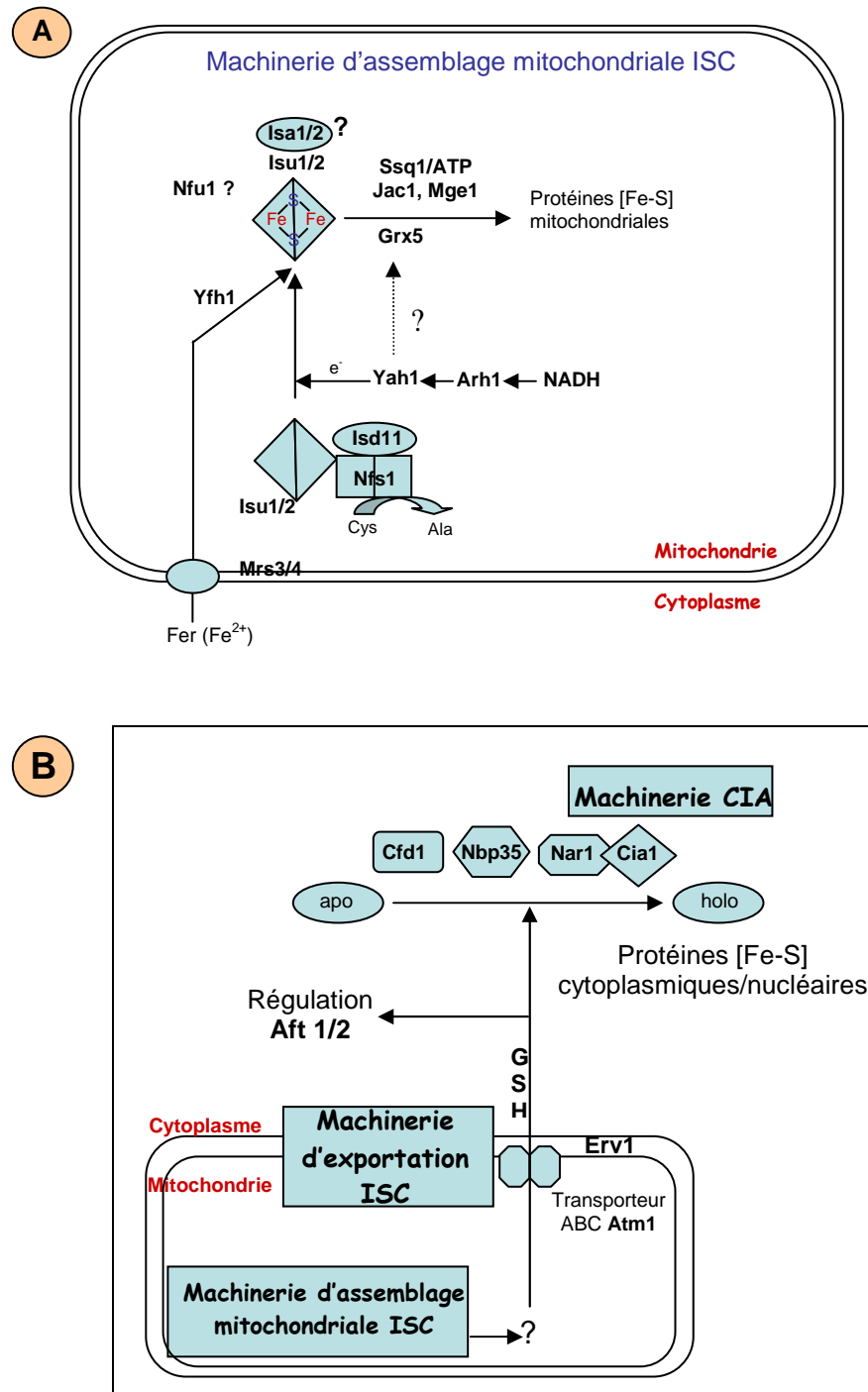


Figure 9 : schémas généraux hypothétiques de la biosynthèse des centres [Fe-S] chez les cellules eucaryotes ; (A) cas des protéines [Fe-S] mitochondriales ; (B) cas des protéines [Fe-S] cytoplasmiques et nucléaires (adapté de (Lill and Mühlhoff, 2006)).

Des défauts ou dysfonctionnements dans l'assemblage des centres [Fe-S] peuvent avoir de lourdes conséquences chez l'homme. En effet, ces défauts, dans les protéines impliquées dans la biosynthèse des centres [Fe-S], peuvent affecter l'homéostasie du fer et conduire à de graves maladies. L'ataxie de Friedreich, maladie neurodégénérative, est l'une des plus connue (Pandolfo, 2006; Wilson, 2006). Elle est due à des mutations dans le gène codant pour la frataxine : une extension du triplet GAA entraîne une faible transcription du gène et l'obtention de faibles taux de frataxine (Campuzano *et al.*, 1996). Cette mutation se traduit notamment par une accumulation du fer dans les mitochondries, une diminution de l'activité des protéines [Fe-S], une diminution de fer dans le cytoplasme, des dépôts de fer sur les fibres du myocarde. Ceci souligne toute l'importance de la maturation des protéines [Fe-S] et donc la nécessité de bien comprendre ce processus afin de palier à d'éventuels défauts et de lutter contre certaines maladies.

II-4- Le système SUF

L'opéron *suf* a tout d'abord été identifié chez *E. coli*. Comme cela a déjà été mentionné, il code pour six protéines. Des analyses ont révélé que deux d'entre elles (SufS et SufA) présentaient une forte homologie de séquence avec des protéines de l'opéron *isc* (IscS et IscA respectivement) (Mihara *et al.*, 1997; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). De plus, des analyses génétiques ont montré que l'expression du système SUF était régulée par le répresseur Fur et le régulateur OxyR (Patzner and Hantke, 1999; Zheng *et al.*, 2001a). Tout ceci semblait indiquer que le système SUF était impliqué dans la biosynthèse des centres [Fe-S]. Des analyses physiologiques complémentaires ont alors permis de montrer clairement toute l'importance de l'opéron *suf* dans ce processus.

II-4-1- Analyses physiologiques

La découverte de l'implication du système SUF dans le processus de biosynthèse des centres [Fe-S] repose sur plusieurs observations :

- Comme cela a déjà été mentionné, chez *E. coli*, lorsque l'opéron *isc* est délété, 2 à 10 % des activités des protéines [Fe-S] sont conservées (Takahashi and Tokumoto, 2002; Tokumoto and Takahashi, 2001). La surexpression de l'opéron *suf* restaure complètement l'activité de ces mêmes protéines. En revanche, l'inactivation des deux opérons *isc* et *suf*, est létale pour la cellule (Takahashi and Tokumoto, 2002).

- La mutation des gènes *sufD* et *sufS* d'*E. coli* induit une forte instabilité du centre [2Fe-2S] de la réductase ferrique FhuF (Patzner and Hantke, 1999).
- La délétion de *sufC* chez *E. chrysanthemi* provoque une diminution de l'import de fer ainsi que la diminution de l'activité d'enzymes à centres [Fe-S] (Nachin *et al.*, 2003).

Malgré la mise en évidence de ces phénotypes, la contribution du système SUF dans la biosynthèse des centres [Fe-S] a tout d'abord semblé mineure, puisque l'absence d'un opéron *suf* fonctionnel n'avait que peu d'effet pour la bactérie *E. coli* dans des conditions normales de croissance (Takahashi and Tokumoto, 2002). En fait, ce n'est que dans des conditions de stress oxydant et de carence en fer que le rôle du système SUF devient évident. Plusieurs observations, chez *E. coli* et *E. chrysanthemi*, ont conduit à cette conclusion :

- Dans des conditions de carence en fer, des mutations sur les gènes *sufS* et *sufD* réduisent la capacité des cellules d'*E. coli* à utiliser la ferrioxamine B comme sidérophore (Patzner and Hantke, 1999).
- Dans des conditions de stress oxydant, la stimulation de l'expression de la protéine SoxS, via le régulateur SoxR, une protéine [Fe-S], est plus faible lorsque le gène *sufC* est muté chez *E. coli* (Nachin *et al.*, 2001).
- Une mutation du gène *sufS* entraîne une sensibilité accrue des cellules d'*E. chrysanthemi* au 2,2,dipyridyl, un chélateur de fer (Nachin *et al.*, 2001).
- Des mutations au sein des gènes *sufC* et *sufD* provoquent une sensibilité accrue des cellules d'*E. chrysanthemi* au paraquat, un agent oxydant (Nachin *et al.*, 2001).
- L'activité des protéines [Fe-S] sensibles à l'oxygène telles que la Fumarase A est beaucoup plus affectée par des agents oxydants dans une souche d'*E. coli* comportant une mutation du gène *sufC* que dans une souche sauvage (Nachin *et al.*, 2003).
- Des souches d'*E. chrysanthemi* mutées pour les gènes *sufB*, *sufC* ou *sufD* perdent leur capacité à utiliser le fer de la chrysobactine, un sidérophore (Nachin *et al.*, 2003).
- La délétion des gènes *sufBCD* induit une faible croissance dans des conditions de carence en fer (Nachin *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2004).
- L'expression des gènes *suf* est induite par l'addition de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ou des générateurs de superoxyde (O₂^{•-}) ainsi que par la carence en fer (Outten *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2001b).

II-4-2- L'importance du système SUF

◆ A travers les espèces

Comme cela a déjà été mentionné (cf tableau 4), le système SUF est présent chez de nombreux organismes procaryotes et a récemment été mis en évidence chez les plantes.

Chez *Synechocystis*, où les deux machineries ISC et SUF coexistent, il a été montré que les gènes *sufB* et *sufC* sont essentiels (Law *et al.*, 2000).

De même, chez *A. thaliana*, la mutation du gène *AtNAP7*, homologue au gène *sufC*, est létale, et la mutation du gène *AtNAP6*, homologue au gène *sufD*, entraîne un développement anormal de la plante (racines courtes, diminution de la teneur en chlorophylle...) (Hjorth *et al.*, 2005; Xu and Moller, 2004). Il convient de noter que chez les plantes, les protéines Suf sont localisées dans les plastes. Ce compartiment est le siège de la photosynthèse et est donc soumis à de fortes concentrations en oxygène. Ceci s'accorde bien avec le fait que l'opéron *suf* intervient dans des conditions particulières dont le stress oxydant.

Enfin, on peut citer le cas de *M. tuberculosis* pour lequel l'opéron *suf* a récemment été identifié comme étant le seul système d'assemblage des centres [Fe-S] (Huet *et al.*, 2005). D'une manière générale, l'infection d'une cellule hôte par un élément pathogène provoque des conditions de stress, l'élément pathogène devant notamment faire face à une quantité de fer disponible limitante. Ceci est cohérent avec le fait que le système SUF intervient dans des conditions particulières et est donc impliqué dans la virulence des éléments pathogènes.

◆ A travers l'évolution

Certaines bactéries ne possèdent que des gènes *suf*, qui sont donc seuls à assurer le bon fonctionnement de la biogenèse des centres [Fe-S] (cf tableau 4). Parmi les gènes *suf*, ce sont les gènes *sufBC* qui sont les plus représentés dans le monde du vivant. Il a alors été proposé que le système SUF, composé tout d'abord des protéines SufB et SufC, ait ensuite évolué en regroupant d'autres composants.

Chez les plantes, les protéines SufB et SufC ont été identifiées et forment un complexe avec une troisième protéine, SufD. Des études ont montré que ces protéines avaient conservé, au cours de l'évolution, leur fonction primitive assurée au sein des cellules procaryotes. En effet, les gènes *sufBCD* d'*A. thaliana* peuvent compléter une souche d'*E. coli* mutée pour ces mêmes gènes (Xu *et al.*, 2005). Néanmoins, chez la plante, la protéine SufB possède une

activité ATPase, inexistante chez la bactérie (Xu *et al.*, 2005). Ceci témoigne de l'évolution du système SUF, ayant acquis des propriétés supplémentaires dans les cellules eucaryotes.

II-4-3- La régulation de l'opéron *suf*

L'importance de la machinerie SUF dans des conditions particulières de stress est cohérente avec les caractéristiques de son système de régulation. En fait, l'expression de l'opéron *suf* est régulée par plusieurs protéines qui ne font pas partie de l'opéron : le répresseur Fur, le régulateur OxyR, le complexe IHF (Integration Host Factor) et le régulateur IscR. Les zones de reconnaissance pour ces différentes protéines ont pu être mises en évidence par les groupes de G. Storz et JH Roe. Il s'agit des régions situées respectivement en position (-236 et -196), (-156 et -127), (-56 et -35) et (-35 et -10) du « site d'interaction de transcription » (Lee *et al.*, 2004; Outten *et al.*, 2004).

La protéine Fur (Ferric Uptake Regulation) induit la transcription des gènes *suf* dans des conditions de carence en fer (Nachin *et al.*, 2001; Patzer and Hantke, 1999). De fait, Fur est un régulateur transcriptionnel qui répond à la concentration intracellulaire en fer ; il a été montré que le fer agit comme un cofacteur, pour activer (grâce à des modifications conformationnelles) la fixation de la protéine Fur sur des séquences spécifiques d'ADN. Cette interaction bloque la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition du fer, et des gènes *suf*. En cas de carence en fer, Fur n'est pas chargée en fer et est incapable d'interagir avec l'ADN. Il y a levée de la répression (figure 10).

Les protéines OxyR, IHF et IscR interviennent dans la réponse au stress oxydant. Elles induisent toutes trois l'expression de l'opéron *suf* en présence d'agents oxydants (Outten *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2001b) (figure 10). Plus particulièrement, OxyR et IHF régulent l'opéron *suf* suite à un stress peroxyde (H_2O_2) ; IscR intervient en réponse à un stress superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et peroxyde (H_2O_2).

En présence de peroxyde d'hydrogène, des ponts disulfures se créent sur la protéine OxyR, qui peut alors, sous cette forme, activer la transcription des gènes *suf*. Cette activation n'a lieu qu'en présence de IHF. IHF est une petite protéine, capable de se lier à l'ADN, et composée de deux sous-unités codées respectivement par les gènes *himA* et *himB*. IHF fait partie de la famille des protéines histones (Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987) et aurait la capacité d'induire une courbure de l'ADN qui faciliterait les interactions protéine-protéine

entre l'ARN polymérase et un activateur proximal. Or, il est à noter que la localisation de la zone OxyR sur le promoteur *suf* est assez inhabituelle car très éloignée du (+1) de transcription. Le mécanisme proposé est donc le suivant : après un stress oxydant, le complexe IHF, en se liant à l'ADN, permet une courbure de celui-ci conduisant à un rapprochement de OxyR du (+1) de transcription et de l'ARN polymérase (Lee *et al.*, 2004). Cependant, l'implication de OxyR dans la réponse au stress oxydant est importante mais pas essentielle ; en effet, l'expression des gènes *suf* est induite par l'addition d'agents oxydants même lorsque le gène *oxyR* est muté ou délété (Lee *et al.*, 2004). Cela suggère l'existence d'un troisième régulateur répondant au stress oxydant. Le site d'interaction de ce facteur avec l'ADN a été localisé et se situe juste en amont du gène *sufA*. De récentes études ont montré qu'il s'agissait de IscR, déjà identifié comme un répresseur de l'opéron *isc* (Yeo *et al.*, 2006).

Cas particulier des cyanobactéries

Chez les cyanobactéries, l'opéron *suf* est également induit dans des conditions de carence en fer et de stress oxydant (Wang *et al.*, 2004). Il existe pourtant une différence majeure. En effet, un gène, *sufR*, situé en amont du gène *sufB* et faisant partie de l'opéron, a été mis en évidence. La protéine SufR est une protéine à centre [Fe-S] dont le mode d'action est similaire à celui de IscR pour l'opéron *isc*, à savoir une levée de la répression lorsque SufR est dépourvue de son centre [Fe-S].

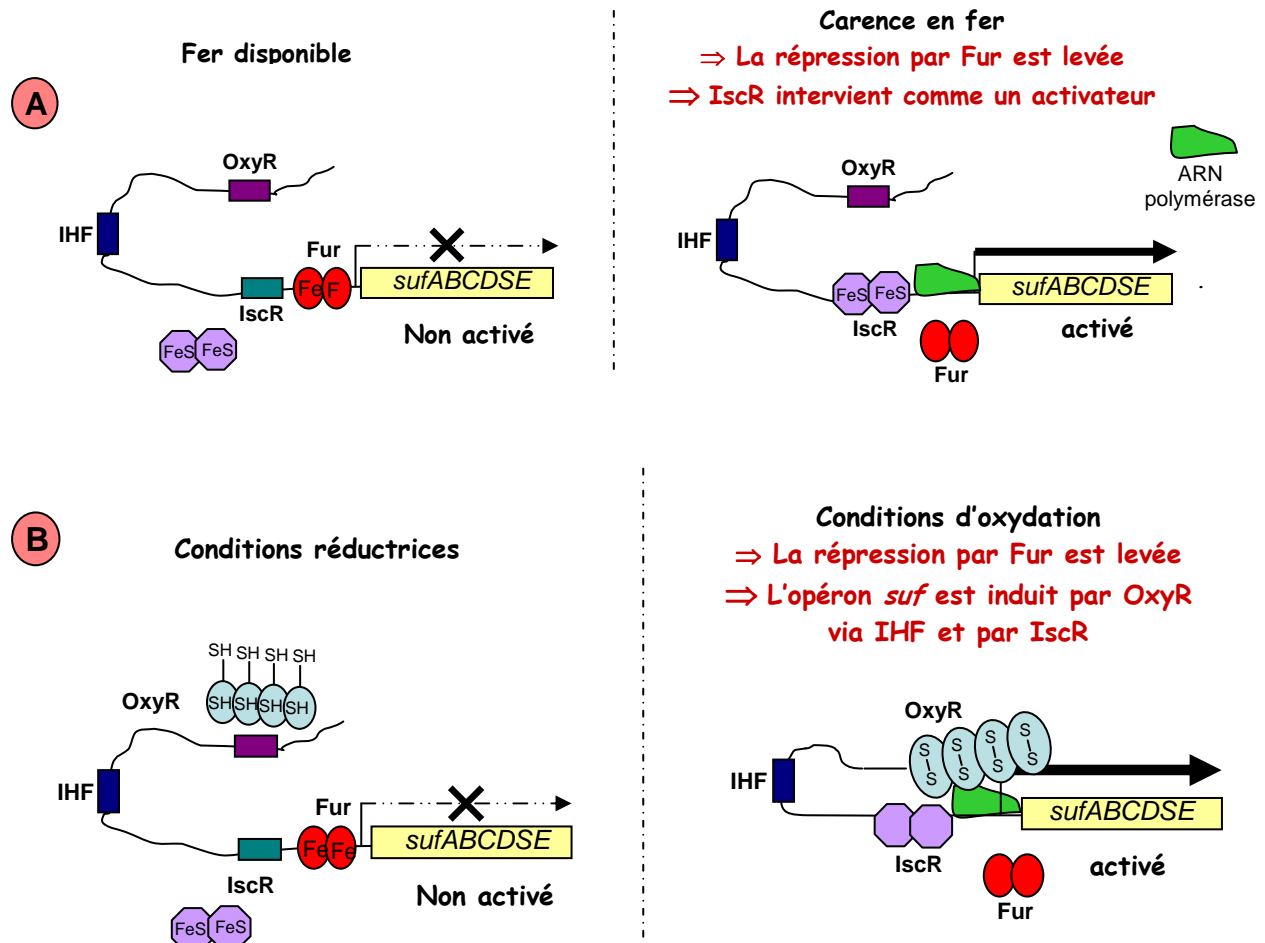


Figure 10 : Modèle proposé pour la régulation de l'opéron *suf* (adapté de (Yeo *et al.*, 2006))

(A) Lorsque le pool de fer est suffisant, Fur fixe du fer comme cofacteur et lie la région promotrice de l'opéron *suf*, ce qui bloque sa transcription. Parallèlement, IscR possède un centre [2Fe-2S] et, dans ce cas, ne lie pas la région promotrice de l'opéron *suf*, ne conduisant donc à aucune activation (alors que, pour rappel, IscR lie la région promotrice de l'opéron *isc*, dans ces mêmes conditions, et réprime alors sa transcription). Dans des conditions de carence en fer, Fur est démétaillée et il y a levée de la répression. Parallèlement, IscR, sous forme apo, se fixe à l'ADN et active la transcription de l'opéron *suf*.

(B) Dans des conditions réductrices, Fur et IscR possèdent leur cofacteur : il y a donc répression par Fur et absence d'activation par IscR. D'autre part, OxyR est sous forme réduite. Dans des conditions d'oxydation, les protéines Fur et IscR sont démétaillées. D'autre part, des ponts disulfures se créent sur OxyR qui, après courbure de l'ADN par IHF, peut lier la région promotrice de l'opéron *suf* et activer sa transcription. En absence de OxyR, l'activation ne se fait que par le biais de IscR.

II-4-4- Les protéines Suf

L'opéron *suf* est composé de six protéines, organisées en deux complexes distincts, nommés SufSE et SufBCD, auxquels s'ajoute la protéine SufA. Cette dernière ne forme aucun complexe avec les protéines de l'opéron aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

II-4-4-a- Le complexe SufSE

Le complexe SufSE est le donneur de soufre dans l'opéron *suf*, de même que IscS l'est pour le système ISC. En effet, il possède une activité cystéine désulfurase portée par SufS (Loiseau *et al.*, 2003; Mihara *et al.*, 1999).

Ainsi, la protéine SufS, qui existe sous la forme d'un homodimère en solution, est capable de mobiliser du soufre et de l'alanine à partir de L-cystéine libre dans la cellule, selon une réaction nécessitant la participation de son cofacteur, le PLP (figure 11). Le soufre est alors stocké sous forme de persulfure sur un résidu particulier de l'enzyme. Il s'agit de la Cys364 chez *E. coli*. Elle est largement conservée parmi les espèces et essentielle à l'activité de la protéine.

La protéine SufS possède une activité cystéine désulfurase faible. Cependant, il a été montré qu'elle formait un complexe stoechiométrique avec la protéine SufE, et le complexe obtenu possède une activité cystéine désulfurase huit à cinquante fois supérieure à celle de SufS seule (Loiseau *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003). Ainsi, la protéine SufE, qui seule n'a aucune capacité à mobiliser du soufre, a la propriété de stimuler fortement l'activité de SufS. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que la Cys51 de SufE, hautement conservée, était essentielle à cette stimulation, suggérant un transfert de soufre de SufS à SufE sur cette cystéine (Mihara *et al.*, 2000; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003). Des études de spectrométrie de masse ont montré la présence d'entités persulfures/polysulfures au niveau de la cystéine 51 de SufE, ce qui a été confirmé par des expériences de marquage isotopique (^{35}S) (Outten *et al.*, 2003). L'utilisation d'une protéine SufE mutée au niveau de la cystéine 51 a révélé que cette cystéine est l'unique site accepteur de soufre. Ces résultats ont permis de proposer le mécanisme représenté figure 12 : la réaction procède, premièrement, par la formation d'un persulfure sur la Cys364 de SufS (comme décrit figure 11). Puis, l'atome de soufre du persulfure est transféré à la Cys51 de SufE par une réaction de transpersulfuration (figure 12) (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003). Le soufre S^0 des persulfures peut être réduit en ions sulfures S^{2-} et libéré *in vitro* par ajout de DTT.

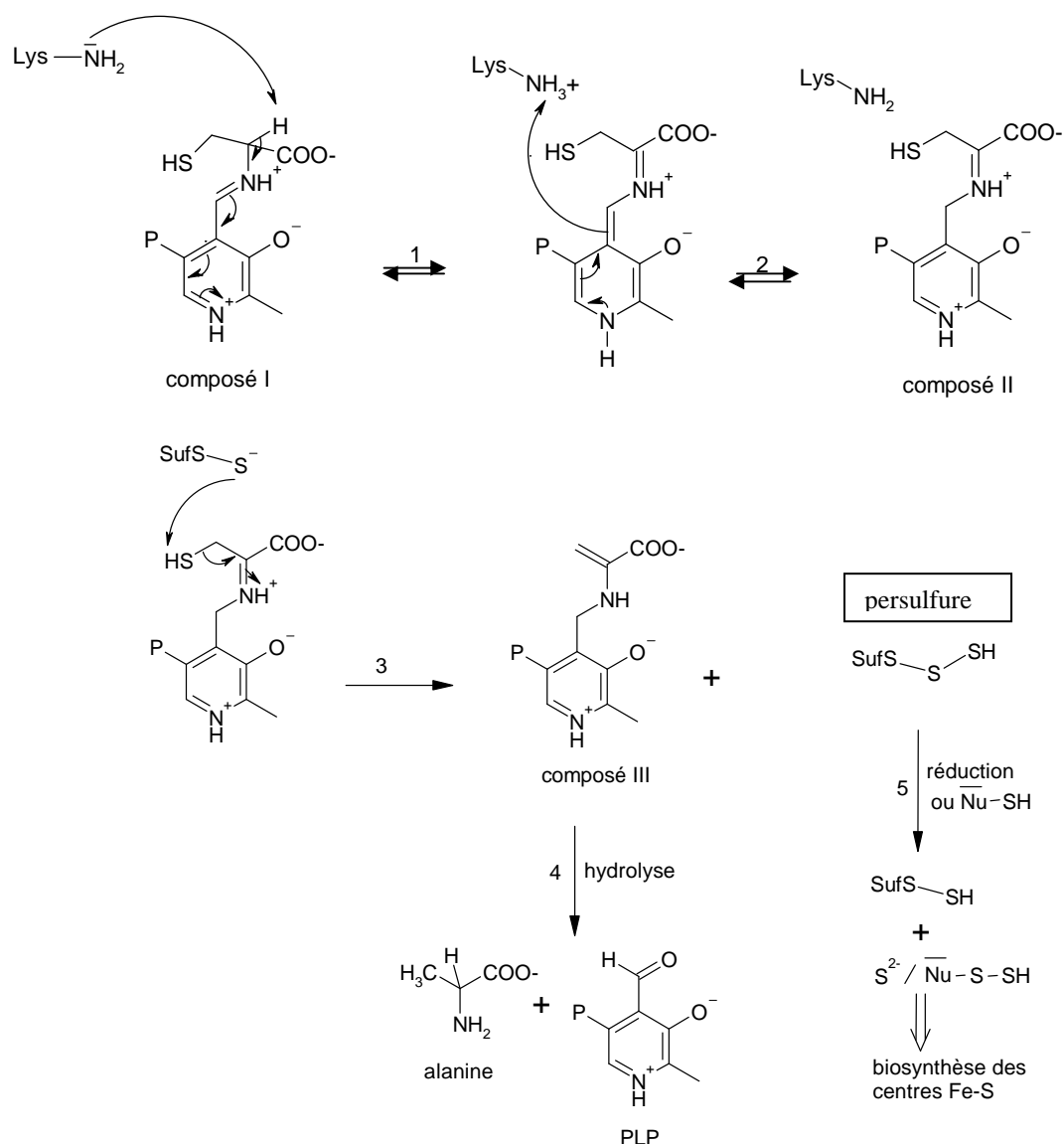


Figure 11 : Mécanisme d'action des cystéines désulfurases

Le pyridoxal-phosphate (noté PLP) est fixé à la protéine de façon covalente au niveau d'un résidu lysine. En présence de cystéine substrat il se forme un composé PLP-cystéine (composé I). Le résidu lysine intervient ensuite en tant que base et permet, selon une catalyse basique, un réarrangement électronique du complexe PLP-cystéine (étapes 1 et 2) qui possède alors une structure de type énamine (composé II). Puis, un résidu cystéine appartenant à la chaîne polypeptidique de la protéine SufS (Cys 364) et qui se trouve sous la forme thiolate S⁻ (avec un caractère nucléophile fort) vient attaquer le soufre de l'adduit PLP-cystéine permettant la formation d'un intermédiaire persulfure, véritable donneur de soufre dans la réaction. Enfin, une hydrolyse du composé III permet de libérer le PLP et de la L-alanine.

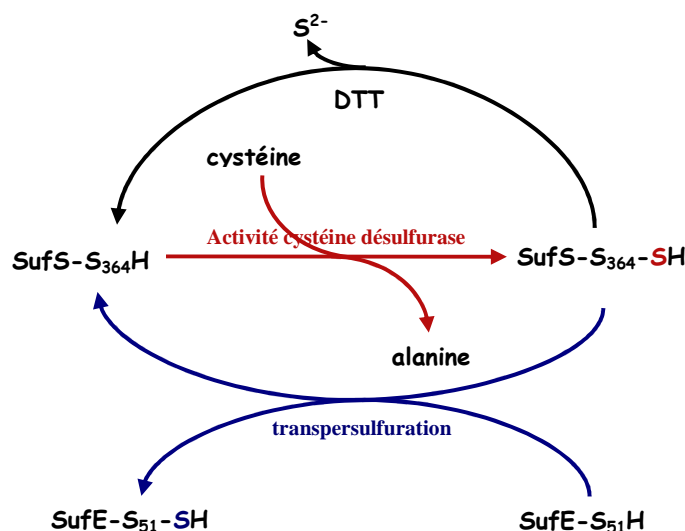


Figure 12 : schéma général de la mobilisation du soufre par le complexe SufSE

Toutefois le mécanisme moléculaire responsable de l'augmentation de l'activité cystéine désulfurase de SufS par SufE n'est toujours pas connu à ce jour. Néanmoins, la résolution de la structure tridimensionnelles de SufS d'*E. coli*, par cristallographie aux rayons X, permet d'émettre des hypothèses concernant les propriétés de la protéine (Fujii *et al.*, 2000; Lima, 2002). En effet, la structure montre que la cystéine 364 est éloignée du site où se trouve l'adduit PLP-cystéine, et est localisée sur une boucle ayant une flexibilité réduite, ce qui rend la formation du persulfure quasi impossible. Ceci expliquerait pourquoi l'activité cystéine désulfurase de SufS est extrêmement faible, comparée aux autres cystéines désulfurases. Ceci s'accorde également avec de récentes études cinétiques montrant qu'en effet l'étape limitante de la réaction est l'attaque nucléophile de l'adduit PLP-cystéine par la cystéine 364 de SufS (Tirupati *et al.*, 2004). D'autre part, la structure cristallographique de SufE montre que la Cys51 est peu accessible (Goldsmith-Fischman *et al.*, 2004). Elle est localisée sur l'extrémité d'une boucle qui lie deux brins β anti-parallèles et se situe dans une cavité hydrophobe. Par conséquent, il est difficile d'envisager une réaction de transpersulfuration entre SufS et SufE sans invoquer un changement conformationnel des deux protéines, permettant le rapprochement entre la cystéine 364 de SufS et l'adduit PLP-cystéine d'une part et une meilleure accessibilité de la Cys51 d'autre part. Ceci rendrait possible la réaction de transpersulfuration qui se traduirait par une augmentation de l'activité cystéine désulfurase de SufS. L'obtention de la structure tri-dimensionnelle du complexe SufSE, toujours non disponible actuellement, permettrait probablement de fournir quelques éclairages sur la question.

II-4-4-b- Le complexe SufBCD

Comme cela a déjà été illustré paragraphe II-4-1, l'inactivation des gènes *sufB*, *sufC* et/ou *sufD* conduit à une sensibilité accrue des cellules d'*E. chrysanthemi* au stress oxydant ainsi qu'à une diminution de la virulence (Nachin *et al.*, 2001; Nachin *et al.*, 2003). Elle provoque également une diminution de l'activité des protéines [Fe-S] sensibles à l'oxygène telle que la Fumarase A chez *E. coli* (Nachin *et al.*, 2003). Les protéines SufBCD sont sans doute les protéines de l'opéron *suf* les plus importantes. D'ailleurs, il a été observé, comme montré dans le tableau 4, que certains organismes ne possèdent que ces protéines, qui doivent donc, à elles seules, assurer la maturation des protéines [Fe-S]. Cependant, leur rôle exact dans le processus de maturation des centres [Fe-S] n'a toujours pas été déterminé.

Des expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* ont montré que les trois protéines SufB, SufC et SufD forment un complexe cytosolique stable (Nachin *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003).

En ce qui concerne les gènes codant pour les protéines SufB et SufD, aucune homologie avec des gènes de fonction connue n'a été mise en évidence. De fait, aucune fonction spécifique n'a pu être associée à ces deux protéines à ce jour.

La protéine SufC, quant à elle, partage un certain nombre de propriétés avec les ATPases de la superfamille des transporteurs ABC (Holland and Blight, 1999). De façon caractéristique, ces protéines, connues pour catalyser l'import / export de divers composés à travers les membranes biologiques, sont constituées de différents domaines : un domaine hydrolysant ayant une activité ATPase, associé à des domaines transmembranaires. Elles possèdent des motifs caractéristiques liés à leur fonction, appelés motifs de Walker A, B, C. Ceux-ci, communs à toutes les ATPases, sont typiques des domaines hydrolysants. SufC possède ces trois motifs. De plus, l'activité ATPase de SufC nécessite la présence de manganèse (Mn) ou de magnésium (Mg), autre particularité des protéines ATPases. Par contre, SufC ne contient pas de segments transmembranaires et se trouve localisée uniquement dans le cytoplasme alors que les ATPases sont localisées au niveau des membranes, ce qui en fait une ATPase atypique (Nachin *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003). Son rôle exact dans la biosynthèse des centres [Fe-S] reste indéterminé.

Plusieurs hypothèses concernant le rôle des protéines SufBCD ont été émises, basées sur des faits expérimentaux. Tout d'abord, il a été montré que le complexe SufBCD augmentait l'activité cystéine désulfurase du complexe SufSE (environ 4 fois), mais pas de la protéine SufS seule (Outten *et al.*, 2003). Cependant, cet effet est indépendant de la présence

d'ATP, ce qui suggère un rôle additionnel ou un autre rôle que celui de stimuler l'activité de SufSE, pour le complexe SufBCD. D'autre part, des études récentes réalisées au laboratoire révèlent que le complexe SufBCD, et notamment, SufBC, interagit avec SufE (Layer *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter qu'aucune des trois protéines du complexe, prise individuellement, n'interagit avec SufE. De plus, aucune des cystéines de SufE n'est essentielle à l'interaction avec SufBCD, qui repose donc, non pas sur la formation de ponts disulfures, mais plutôt sur l'existence de forces non covalentes entre les protéines. L'importance fonctionnelle de cette interaction au sein du système SUF a ensuite été étudiée. Il a alors été démontré que la présence de SufBC suffit à stimuler l'activité cystéine désulfurase de SufSE (x 2), dans les mêmes proportions que le complexe SufBCD. De plus, un transfert de soufre de SufE à SufB a pu être mis en évidence par spectrométrie de masse, avec la formation de persulfures / polysulfures au niveau de résidus cystéines de la protéine SufB. Enfin, en présence de fer et d'électrons, la forme soufrée de la protéine SufB est capable de former en son sein un centre [Fe-S], de type $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$, réductible et stable. Ce résultat nous conduit aujourd'hui à deux hypothèses. Le cluster de SufB pourrait avoir une fonction rédox qu'il reste à identifier au sein du processus de biosynthèse des centres [Fe-S]. L'autre possibilité est que SufB soit une protéine scaffold. Cependant les protéines scaffold connues actuellement ont la particularité d'assembler des centres [Fe-S] extrêmement labiles, instables lors de la réduction, et non observables en Résonance Paramagnétique Electronique. SufB serait alors une protéine scaffold d'un type unique puisque son cluster peut être facilement réduit en un état stable $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$. On peut noter que les Archées et certaines bactéries (voir tableau 4) ne possèdent que les protéines SufBCD, mais pas SufA (ni IscA ou IscU), ce qui suggère que, dans ces cas, le complexe SufBCD assure à lui seul la maturation des protéines [Fe-S] et possède donc un rôle comme complexe d'échafaudage pour les protéines [Fe-S], rôle porté probablement par SufB.

Trouver une relation entre l'activité ATPase de SufC et l'existence d'un cluster [Fe-S] dans SufB constitue les objectifs du laboratoire actuellement. SufBCD pourrait fonctionner comme un canal permettant le transport de soufre ou de clusters [Fe-S] vers une protéine cible. Sa fonction étant révélée en conditions de stress oxydant, ce complexe protégerait la molécule transportée (atomes de soufre ou centres [Fe-S]) d'une oxydation éventuelle. Cette protection éviterait un relargage de fer et/ou de soufre dans le milieu, ces éléments étant toxiques pour la cellule.

II-4-4-c- La protéine SufA

SufA est une petite protéine cytoplasmique homodimérique, homologue à la protéine IscA, présente dans l'opéron *isc* (figure 4). Comme le montre la figure 8, elles constituent une usine d'assemblage des centres [Fe-S] au sein de l'opéron *suf* ou *isc* respectivement. De fait, de nombreuses études ont été réalisées ces dernières années, notamment au laboratoire, sur ces deux protéines (Krebs *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Comme nous l'avons déjà mentionné, elles ont d'abord été caractérisées comme des protéines « scaffold » au sein desquelles les atomes de fer et de soufre sont préassemblés transitoirement en un centre [Fe-S], lequel est ensuite transféré à différentes apoprotéines cibles. Comme cela a déjà été mentionné, les protéines « scaffold » sont classées selon deux catégories, basées sur leur séquence en acides aminés contenant ces cystéines conservées. Les protéines « scaffold » de type U (IscU, NifU) possèdent le motif caractéristique CX_nCX_pC alors que les protéines « scaffold » de type A (IscA, SufA) contiennent le motif CX₆₃CGC.

Les études menées jusqu'à mon arrivée au laboratoire sur la protéine SufA ont permis d'établir les propriétés suivantes (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003) : (i) SufA est obtenue principalement sous la forme apo après purification aérobie en milieu riche (seules des traces de fer et/ou de soufre (quantités inférieures à 0,1 atome de fer et de soufre par monomère) sont présentes après purification) ; (ii) SufA est capable de chélater des centres [Fe-S] (mélange de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S]) après traitement de l'apoprotéine avec du fer (Fe²⁺) et du soufre (S²⁻) en conditions d'anaérobiose ; (iii) Ces centres [Fe-S] sont instables (à l'oxygène, et lors de la réduction) et peuvent être transférés efficacement à une apoprotéine cible de type [2Fe-2S] ou [4Fe-4S].

◆ La forme holo de SufA (contenant un centre [Fe-S])

En général, après reconstitution chimique, un monomère de SufA ne peut pas lier plus de deux atomes de fer et deux atomes de soufre. Cependant l'analyse de ces préparations par spectroscopie Mössbauer a montré que deux formes de centres, [2Fe-2S] et [4Fe-4S], existaient dans ces conditions (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). SufA contiendrait alors un mélange de polypeptides chélatant un centre [2Fe-2S] par monomère et de polypeptides chélatant un centre [4Fe-4S]. Ce dernier pourrait se situer entre deux sous-unités ou être

présent dans une seule unité, la deuxième étant dépourvue de centre. La présence de ces différents centres dans SufA peut s'expliquer de la façon suivante :

- SufA contient un centre [2Fe-2S] à partir duquel un centre [4Fe-4S] peut se former artificiellement en raison de l'excès de fer et de soufre présent dans le milieu réactionnel.
- SufA contient un centre [4Fe-4S] pouvant se décomposer en un centre [2Fe-2S].
- SufA est capable d'assembler les deux types de centres.

Le mécanisme d'assemblage des centres [Fe-S] n'était pas connu.

◆ *Le transfert du centre [Fe-S]*

Il a été observé que la protéine SufA était capable de transférer efficacement ses centres [Fe-S] à diverses apoprotéines cibles (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). En effet, une même préparation de holoSufA peut transférer soit un centre [2Fe-2S] à la ferrédoxine d'*E. coli* (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003), soit un centre [4Fe-4S] à la biotine synthase d'*E. coli* (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004). Cette caractéristique est commune à toutes les protéines « scaffold » (IscU, IscA, SufA et NifU) (Nishio and Nakai, 2000; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Unciuleac *et al.*, 2007; Wollenberg *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002b). La question de la spécificité du transfert se pose alors. En effet, il n'y a pas de systèmes spécifiques pour l'assemblage et le transfert de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Comment ces protéines font-elles alors pour transférer des centres [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] suivant la nature de la protéine cible ? A quel niveau se fait la reconnaissance ? Ce point n'a toujours pas été éclairci à l'heure actuelle.

Plusieurs études ont été menées, notamment au laboratoire, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du transfert du centre [Fe-S] des protéines « scaffold », et de SufA en particulier, aux apoprotéines cibles. Les propriétés du transfert qui ressortent sont énoncées ci-dessous.

Tout d'abord, il apparaît que le cluster est transféré tel quel, en bloc, depuis la protéine SufA vers la protéine cible, et non pas dégradé pour être ensuite reconstitué au sein de la protéine acceptrice. En effet, la présence de chélateurs de fer, tels que la bathophénantroline, n'inhibe pas le processus de transfert, montrant que le cluster est protégé du solvant (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Des expériences similaires ont été réalisées sur la protéine « scaffold » Isu et ont conduit à la même conclusion. La protéine, préalablement

reconstituée avec du ^{57}Fe , a été incubée avec de l'apoferrédoxine humaine, en présence de ^{56}Fe en solution. Aucun échange entre le ^{57}Fe et le ^{56}Fe n'a été observé lors du transfert du cluster au sein de la ferrédoxine, démontrant donc une fois de plus que le cluster est protégé du solvant pendant la réaction (Wu *et al.*, 2002c).

D'autres études ont montré que le transfert du cluster passait tout d'abord par la formation d'un complexe entre la protéine « scaffold » et la protéine cible. Ceci a été observé dans plusieurs cas, SufA et la biotine synthase (BioB) (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004), IscA et la ferrédoxine (Fdx) (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001), Isu et Fdx (Wu *et al.*, 2002c) ainsi que Isa et Fdx (Wu *et al.*, 2002a), et en utilisant différentes techniques (chromatographie d'affinité et cross-linking). On peut remarquer qu'on ne dispose pas d'exemple d'interaction d'une protéine scaffold avec une protéine cible de type [3Fe-4S]. Les expériences effectuées au laboratoire avec la protéine holo-SufA et la biotine synthase comme protéine acceptrice ont permis de mettre en évidence que le complexe formé entre les deux protéines est basé sur des interactions non covalentes et semble mettre en jeu uniquement la protéine « scaffold » sous forme holo et la protéine cible sous forme apo (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004). En effet, aucun complexe ne se forme si la protéine cible contient déjà un centre [Fe-S], ou lorsqu' apoSufA est incubée avec apoBioB, ou encore si holoSufA est incubée avec holoBioB. Ceci suggère que la présence du cluster au sein des protéines contrôle leur association. De plus, des études cinétiques ont révélé que la formation du complexe entre SufA et BioB était un processus rapide, tout comme le transfert du cluster, qui se produisent en quelques minutes. Par contre, la dissociation du complexe, aboutissant à la forme active libre de holoBioB est une étape lente ($k = 0.03 \text{ min}^{-1}$).

Enfin, des expériences similaires ont été réalisées avec un mutant de la protéine BioB, dans laquelle une des cystéines ligands du centre [4Fe-4S], la Cys53, a été changée en alanine (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004). Il a alors été observé que le complexe est toujours présent, montrant que les cystéines de la protéine acceptrice ne participent pas aux interactions nécessaires à l'association des deux protéines. En revanche, le transfert du centre [Fe-S] de holoSufA à la protéine cible sous forme apo, ainsi que la dissociation du complexe formé entre les deux protéines, n'ont pas lieu. Ceci suggère que le processus de transfert est guidé par l'attaque directe des cystéinates de la protéine acceptrice sur le centre [Fe-S] de SufA. La réaction de transfert pourrait donc être décrite comme une attaque nucléophile au cours de laquelle les cystéines de la protéine SufA sont libérées et remplacées par celles de la protéine BioB.

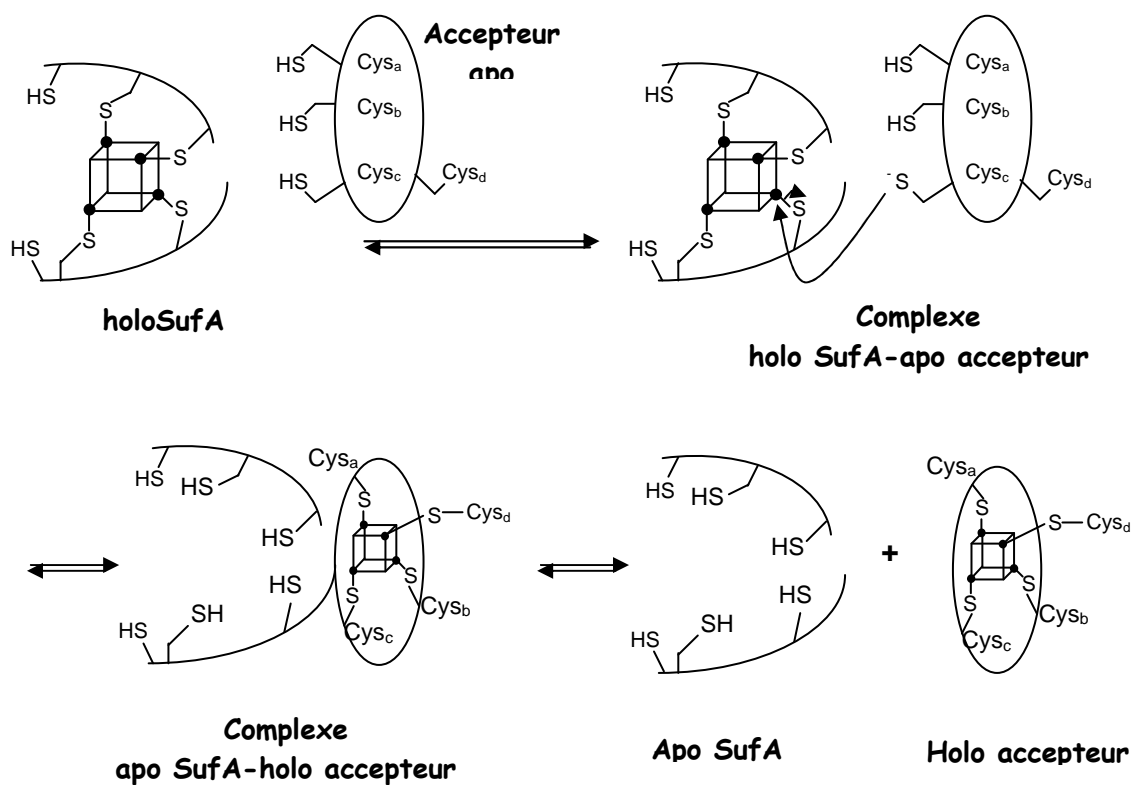


Figure 13 : Schéma proposé pour le transfert du cluster [Fe-S] de holoSufA, représentée sous forme de dimère, à une protéine cible, en prenant comme hypothèse que SufA contient un centre [4Fe-4S] par dimère. Le cluster a été localisé à l'interface de deux monomères de façon arbitraire.

III- Objectifs de la thèse : Etude moléculaire de la formation du centre [Fe-S] dans SufA

La biosynthèse des centres [Fe-S] est aujourd'hui un domaine de recherche très compétitif et les connaissances acquises ont progressé très rapidement durant ces dernières années. Cependant, comme nous venons de le voir, beaucoup de points doivent être éclaircis pour mieux comprendre de façon générale le fonctionnement des processus d'assemblage des clusters. Plus particulièrement, de nombreuses questions subsistent quant à la caractérisation et au fonctionnement des protéines dites « scaffold ».

Dans ce contexte, je me suis intéressée, au cours de ma thèse, à la caractérisation fonctionnelle de la protéine SufA, en utilisant des approches biochimiques, spectroscopiques et de biologie moléculaire.

◆ *Les mécanismes moléculaires d'assemblage des centres [Fe-S]*

Très peu de choses étaient connues concernant les mécanismes moléculaires de formation du cluster [Fe-S] au sein de la protéine SufA et des protéines « scaffold » en général. L'idée était de comprendre comment et dans quel ordre s'effectue l'insertion des atomes de fer et de soufre au niveau des cystéines conservées de SufA, définies par la suite comme étant le site actif de la protéine.

Pour ces travaux, les deux mécanismes possibles (insertion du fer puis du soufre et inversement, insertion du soufre puis du fer) ont été envisagés.

◆ *La nature des centres [Fe-S] dans la protéine SufA d'E. coli*

Il était connu que la protéine SufA, contient, après reconstitution chimique, un mélange de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] dont les proportions varient suivant les expériences, comme cela a été montré par spectroscopie Mössbauer, (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Il était difficile de dire si cela correspondait à une propriété intrinsèque de la protéine due à sa fonction ou alors à un artefact dû aux conditions expérimentales. Une hétérogénéité similaire de centres a été rencontrée dans le cas des protéines IscA d'*A. vinelandii* et d'*E. coli* (Krebs *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001), alors que seuls des centres [2Fe-2S] ont été détectés dans IscA de *S. pombe* et de *Synechocystis* après reconstitution (Morimoto *et al.*, 2002; Wollenberg *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2002a). De plus, dans ce dernier cas, les avis

divergeaient quant à la quantité de fer par chaîne polypeptidique : soit un atome de fer, soit deux atomes de fer par chaîne polypeptidique.

L'identification de la nature du cluster au sein des protéines « scaffold » restait donc un problème clé. Deux approches ont été utilisées pour tenter de répondre à cette question :

- nous avons reconstitué chimiquement SufA, en faisant varier les conditions de réaction, afin de voir s'il était possible d'obtenir une préparation homogène de centre.
- nous avons purifié la protéine SufA en conditions anaérobies, à partir de l'opéron *suf*, de sorte à obtenir une protéine native métallée sans traitement chimique. Ce dernier point s'inscrit également dans la controverse concernant la fonction des protéines de type A comme donneur de fer ou protéines scaffold.

◆ La nature des ligands des centres [Fe-S] dans la protéine SufA d'*E. coli*

Comme mentionné précédemment, les protéines « scaffold » de type A possèdent trois résidus cystéines largement conservés (CX₆₃CGC) (voir alignement de séquence figure 7), proposés comme étant les ligands des centres [Fe-S] et essentiels à l'activité des protéines. En fait, le rôle exact de ces résidus dans l'assemblage et la coordination des clusters n'est pas clairement établi. Des expériences menées *in vivo* sur Isa1p de la levure *S. pombe* ont montré que ces trois cystéines étaient essentielles à la fonction de la protéine (Jensen and Culotta, 2000; Kaut *et al.*, 2000). Par contre, les mutants Cys→Ala de Isa1p sont tout aussi capables que la forme sauvage d'incorporer *in vitro* des centres [2Fe-2S] avec une efficacité de transfert identique (Wu and Cowan, 2003). Enfin, des expériences réalisées *in vitro* sur IscA de *Synechocystis* ont montré que seules les cystéines de la partie C-terminale étaient essentielles pour la formation et le transfert du cluster [2Fe-2S] (Wollenberg *et al.*, 2003).

En construisant, notamment, les trois mutants simples Cys→Ser de SufA d'*E. coli*, j'ai tenté d'identifier le rôle des trois cystéines dans la chélation du cluster [Fe-S].

Matériels et Méthodes

I – Matériels Biologiques

I-1- Souches bactériennes

◆ *Escherichia coli* BL21(DE3)

Ces bactéries ont le génotype suivant : F-*ompT hsdS_B* (*r_B⁻*, *m_B⁻*) *gal dcm* (DE3).

Ce système est utilisé pour la surproduction de protéines dont les gènes sont sous la dépendance de promoteurs de phage T7. L'insert chromosomique DE3 est issu du phage λ et contient le gène codant pour la T7 RNA polymérase. Il est sous contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG).

◆ *Escherichia coli* DH5 α

Ces bactéries ont le génotype suivant : F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 *recA1 endA1 gyrA95 thi-1, hsdR17*(*r_k⁻*, *m_k⁺*) *supE44 relA1 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169. Cette bactérie est utilisée pour la préparation de plasmides. Elle est déficiente en endonucléases (*endA*), ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologue, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

◆ *Escherichia coli* C43(DE3)

Ces bactéries sont dérivées des bactéries BL21(DE3). Elles contiennent également l'insert chromosomique DE3 et sont aussi inductibles à l'IPTG. Elles sont souvent utilisées pour la surexpression de protéines toxiques ou peu solubles.

◆ *Escherichia coli* Top10

Cette souche a le génotype suivant : F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) - ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU galK rspL* (Amp^R) *endA1 nupG*. Généralement utilisées pour du clonage, ces cellules ont servi, dans notre cas, pour la surproduction de protéines.

I-2- Vecteur de surexpression

◆ Le vecteur pET-22b+

Ce vecteur contient, en amont du site de clonage multiple, un promoteur T7 inducible à l'IPTG. Il possède également le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline grâce à l'expression de la β -lactamase. Les gènes *sufA*, *sufE*, et *sufS* ont été clonés dans ce vecteur pET-22b+ aux sites de restriction [NdeI-XhoI]. Les plasmides obtenus sont notés respectivement pET-A_{his}, pET-E_{his} et pET-S_{his}. Ils codent pour les protéines SufA, SufE et SufS comportant une étiquette polyhistidine en C-terminal et notées par la suite SufA_{his}, SufE_{his} et SufS_{his}. Le plasmide pET-A_{his} a également servi de matrice pour l'obtention par PCR des protéines mutantes de SufA, contenant donc également une étiquette polyhistidine en C-terminal ainsi que d'une protéine SufA ne comportant pas d'extension polyhistidine et nommée SufA_{STOP}.

◆ Le vecteur pET-21

Ce vecteur contient également un promoteur T7 inducible à l'IPTG et porte le gène résistant à l'ampicilline. Il a servi à l'expression de la ferrédoxine, à partir du plasmide noté pET21-EcFdx, contenant le gène *fdx*.

◆ Le vecteur pQE-30

Ce vecteur contient le promoteur T5 inducible à l'IPTG. Il confère la résistance à l'ampicilline. Le plasmide pQE-30-IscA, contenant le gène codant pour la protéine IscA cloné aux sites de restriction [BamHI-SalI], a été fourni par l'équipe de Takahashi (Tokumoto *et al.*, 2002). Il permet l'expression d'une protéine comportant une étiquette polyhistidine en N-terminal.

◆ Le vecteur pBAD

Ce vecteur contient, en amont du site de clonage multiple, le promoteur *araBAD*, inducible par la L-arabinose. Ce vecteur confère également la résistance à l'ampicilline. L'opéron *suf* a été cloné aux sites de restriction [EcoRI-NcoI]. Le plasmide obtenu, noté pGSO164 *sufD*_H128A, code ainsi pour les six protéines de l'opéron *suf* (SufA, SufB, SufC, SufD_H128A, SufS, SufE), la protéine SufD comportant une mutation.

I-3- Milieux de culture

La composition des milieux de culture a été décrite précédemment (Sambrook *et al.*, 1989). Le milieu généralement utilisé pour les cultures bactériennes est le milieu riche LB (liquide et solide Luria Bertani). Ce milieu a été obtenu chez AthenaES. Pour la production d'une protéine SufA marquée avec du ^{15}N (dans le but d'une étude par RMN), les cellules ont été cultivées dans un milieu minimum M9 pour lequel le composé $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ est la source d'azote.

II – Méthodes de biologie moléculaire

II-1- Introduction d'ADN dans *E. coli*

II-1-1- Préparation des cellules compétentes

Toutes les étapes se déroulent stérilement.

100 mL de LB sontensemencés à 2% avec une préculture de bactéries BL21(DE3), DH5 α ou Top10 réalisée sur la nuit. Les cellules sont alors cultivées à 37°C, sous agitation, jusqu'en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0,6$) ; puis la croissance est arrêtée en laissant reposer les cultures dans la glace pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 5000 rpm, les culots sont repris dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH=8, NaCl 50 mM. Les cellules sont de nouveau centrifugées à froid à la même vitesse, puis resuspendues dans 50 mL de CaCl_2 30 mM et maintenues à 4°C pendant 20 minutes. Le traitement des cellules par les ions divalents Ca^{2+} altère les membranes en créant des microperforations dans la bicouche lipidique, ce qui facilitera la transformation par un ADN exogène. Après une nouvelle centrifugation, les bactéries sont reprises dans 5 mL de CaCl_2 30 mM, 15% glycérol puis aliquotées et congelées dans l'azote liquide. Les cellules compétentes sont alors conservées à -80°C.

II-1-2- Transformation des cellules compétentes

Dans un tube eppendorf stérile, 100 μL de cellules compétentes sont incubés à 4°C avec 100 à 500 ng de vecteur de surexpression pendant 30 minutes. Un choc thermique,

réalisé à 42°C pendant 2 minutes, permet la transformation des bactéries. En effet, ce traitement accentue la destabilisation de la bicouche lipidique et stimule la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Celles-ci sont ensuite remises 2 minutes à 4°C, puis reprises dans 500 µL de milieu LB, et laissées 1 heure sous agitation à 37°C. Les cellules transformées sont étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB-agar, additionné des antibiotiques appropriés (ici ampicilline 100 µg/mL). Les boîtes sont placées une nuit à 37°C. Les colonies formées sont celles contenant le vecteur de surexpression.

II-1-3- Préparation d'ADN plasmidique

Cette étape est réalisée à l'aide du kit QIAprep® Miniprep (Qiagen) qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 10 mL de culture de cellules DH5α transformées avec le plasmide désiré. Après collecte des cellules par centrifugation, celles-ci subissent une lyse alcaline, en présence de RNase, ainsi qu'une précipitation de l'ADN génomique par l'acide acétique. L'ADN est alors éliminé par centrifugation, et le surnageant déposé sur une colonne comportant une membrane constituée de gel de silice, permettant une adsorption sélective de l'ADN plasmidique, en présence d'une forte concentration en sel. Après un lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les protéines, l'ADN plasmidique est élué avec un tampon de faible force ionique (eau ou tampon EB : Tris 10 mM pH 8,5). L'ADN plasmidique purifié est stocké à -20°C.

II-2- Amplification par PCR - Mutagenèse dirigée

II-2-1- Amplification des plasmides pET-A_{C50S}, pET-A_{C114S}, pET-A_{C116S}, pET-A_{C116A} et pET-A_{STOP} contenant une mutation sur le gène *sufA*

L'amplification en chaîne par l'ADN polymérase (PCR) permet de synthétiser des fragments d'ADN ou des plasmides entiers. Elle s'effectue en utilisant 2 oligonucléotides qui vont servir d'amorces, une matrice d'ADN et une ADN polymérase thermorésistante. La réaction consiste en une répétition de 3 étapes qui forment un cycle de température : une étape de dénaturation (séparation des 2 brins de l'ADN matrice), une étape d'hybridation (appariement des amorces à leur séquence complémentaire sur la matrice d'ADN) et une étape d'élongation (synthèse de l'ADN complémentaire par la polymérase).

L'insertion de mutations dans le gène *sufA* au niveau des résidus cystéines a été réalisée par mutagenèse dirigée suivant les recommandations proposées par Stratagene (Quick Change Site-Directed Mutagenesis). Selon cette technique, le plasmide pET-A_{his} a servi de matrice pour l'amplification par PCR, à partir de 2 oligonucléotides contenant la mutation désirée, chacun étant complémentaire d'un des 2 brins d'ADN du plasmide pET-A_{his}. La polymérase utilisée est la Pfu ultra (Stratagene), capable de synthétiser des brins d'ADN de grande taille (jusqu'à 9 kb). Le produit de la réaction est ensuite digéré par l'endonucléase DpnI qui coupe spécifiquement les ADN méthylés et qui donc va seulement digérer le plasmide parental ne comportant pas la mutation.

Quatre mutants de la protéine SufA (SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} et SufA_{C116A}) ont été construits par cette technique. Cette méthode de mutagenèse dirigée a également été utilisée afin d'obtenir la protéine SufA_{STOP} ne possédant pas d'extension polyhistidine. Pour cela, un codon STOP a été inséré en aval du gène *sufA* et juste avant les bases codant pour les 6 résidus histidines.

La séquence des amorces utilisées pour construire les différents mutants ainsi que les conditions de réaction sont listées respectivement dans les tableaux 6 et 7.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
SufA C50S-1	AAG CAA ACG GGC <u>TCC</u> GCG GGC TTT GGC
SufA C50S-2	GCC AAA GCC CGC <u>GGA</u> GCC CGT TTG CTT
SufA C114S-1	GCC CAG AAT GAA <u>TCT</u> GGC TGT GGC GAA
SufA C114S-2	TTC GCC ACA GCC <u>AGA</u> TTC ATT CTG GGC
SufA C116S-1	AAT GAA TGT GGC <u>TCT</u> GGC GAA AGC TTT
SufA C116S-2	AAA GCT TTC GCC <u>AGA</u> GCC ACA TTC ATT
SufA C116A-1	AAT GAA TGT GGC <u>GCT</u> GGC GAA AGC TTT
SufA C116A-2	AAA GCT TTC GCC <u>AGC</u> GCC ACA TTC ATT
SufA-STOP-1	GGC GAA AGC TTT GGG GTA <u>TAG</u> CTC GAG CAC CAC CAC CAC
SufA-STOP-2	GTG GTG GTG GTG CTC GAG <u>CTA</u> TAC CCC AAA GCT TTC GCC

Tableau 6 : amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée sur le gène *sufA*. Les bases mutées sont indiquées en gras / couleur bleue. Les codons soulignés codent alors pour une sérine dans les trois premiers cas, et pour une alanine dans le quatrième cas. Dans le dernier cas, le codon souligné est un codon STOP inséré avant les histidines (codon CAC).

Réactifs	Mutants SufA _{C50S} ; SufA _{C114S} ; SufA _{C116S}		SufA _{C116A}		SufA _{STOP}	
Eau stérile	35 µL		37,7 µL		15 µL	
Amorce 1	2 µL	840 ng	2 µL	120 ng	2 µL	120 ng
Amorce 2	2 µL	840 ng	2 µL	120 ng	2 µL	120 ng
pET-A _{his}	3 µL	17,4 ng	1,3 µL	10 ng	1,3 µL	10 ng
Buffer x10	5 µL		5 µL		2,5 µL	
dNTPs (10 mM)	2 µL		2 µL		0,5 µL	
Polymérase	1 µL		1 µL		0,5 µL	
Volume final	50 µL		50 µL		25 µL	

Tableau 7 : mélanges réactionnels effectués pour l'amplification du plasmide pET-A_{his} contenant une simple mutation ou une insertion d'un codon STOP.

Les conditions d'amplification sont décrites dans les tableaux 8. Typiquement, le mélange réactionnel est tout d'abord porté à 94°C pendant 30 secondes afin de dénaturer l'ADN parental. Plusieurs cycles de température (N cycles) permettent ensuite l'amplification de l'ADN muté. L'amplification se termine par une étape d'élongation de 10 minutes à 68°C. La PCR a été effectuée sur un appareil Robocycler gradient 40 (Stratagene).

Etape 1	94 °C, 30 sec
Etape 2	94 °C, 30 sec
	X °C, 1 min
	68 °C, Y min
Etape 3	68°C, 10 min

Mutants	X	Y	N
SufA _{C50S}	45 °C	13 min	18
SufA _{C114S}	45°C	13 min	18
SufA _{C116S}	45°C	13 min	18
SufA _{C116A}	55°C	11 min	16
SufA _{STOP}	55°C	11 min	18

Tableaux 8 : conditions d'amplification par PCR.

X : température d'hybridation ; Y : température d'élongation ; N : nombre de cycles de température.

II-2-2- Analyse des produits PCR : gel d'agarose et séquençage

L'ADN plasmidique obtenu après l'amplification par PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Un volume de tampon de charge (0,25 % de bleu de bromophénol, 2,25 % de xylène cyanol, 30 % de glycérol) est ajouté à 5 volumes de solution d'ADN. Le mélange est déposé sur gel d'agarose, de même que des marqueurs de taille allant de 250 à 10000 pb) (Fermentas). Après migration sous une tension de 135 V dans du tampon TAE (Tris 20 mM, acétate 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,3) pendant 20 minutes environ, le gel est plongé dans une solution de BET afin de révéler l'ADN. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et la fluorescence du complexe formé est révélée sous lumière UV ($\lambda=260$

nm). La comparaison avec les marqueurs de taille permet de déterminer la taille (approximative) du fragment d'ADN étudié.

Le mélange réactionnel obtenu après PCR et vérifié par gel d'agarose est ensuite utilisé pour transformer des cellules compétentes DH5 α . L'ADN plasmidique contenant a priori la mutation désirée est alors extrait et purifié puis séquencé par la société Genome Express (Meylan, France) afin de vérifier l'intégrité de la séquence du gène muté.

III- Obtention des protéines

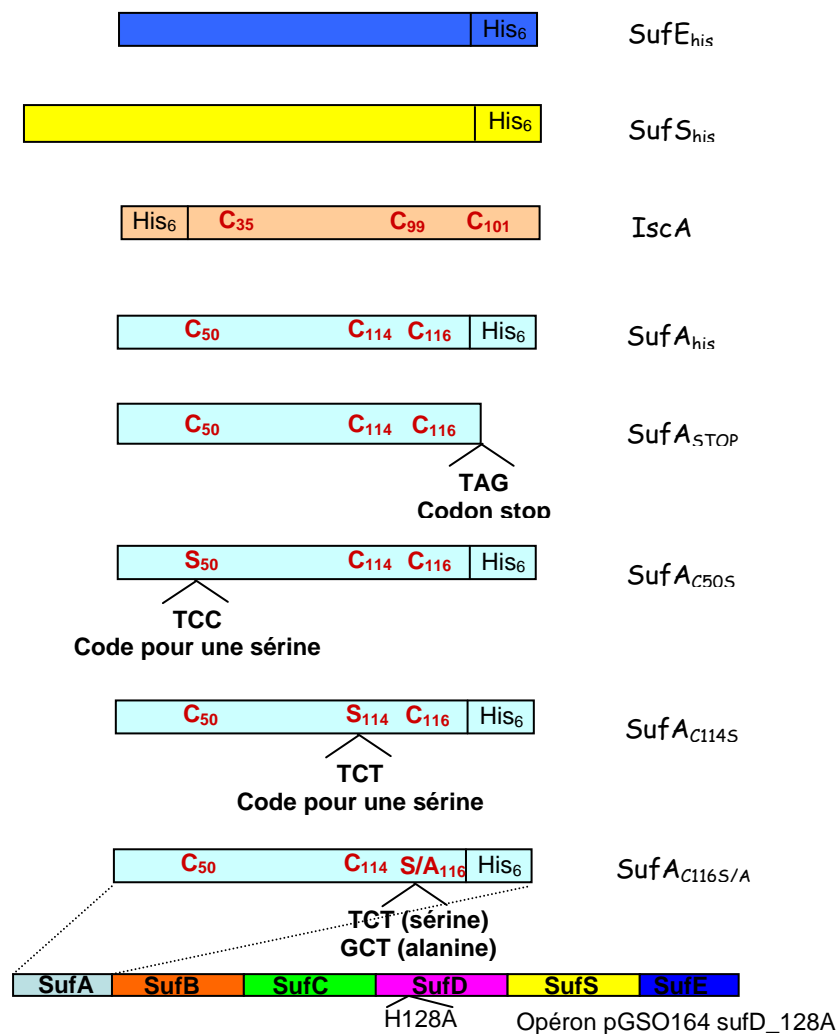


Figure 14 : représentation schématique des différentes protéines purifiées et utilisées au cours de ma thèse

III-1- Purification des protéines SufA, SufE, SufS et IscA

III-1-1- Surexpression des protéines SufA, SufE, SufS et IscA

La souche *E. coli* BL21(DE3) est transformée par l'un des plasmides pET-A_{his}, pET-E_{his}, pET-S_{his}, pET-A_{C50S}, pET-A_{C114S}, pET-A_{C116S}, pET-A_{C116A}, pET-A_{STOP} ou encore pQE30-IscA suivant la protéine à surexprimer. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB-agar, contenant 100 mg/L d'ampicilline. Une colonie isolée sur boîte de Pétri est alors mise en culture dans 100 mL de milieu LB additionné d'ampicilline (concentration finale = 100 µg/mL). Après une incubation d'une nuit à 37°C, sous agitation (180 rpm), cette préculture sert à inoculer 5L de milieu LB/ampicilline à 1,5 % ou 5L de milieu M9 marqué à 1 % (dans le cas où l'on veuille obtenir la protéine marquée pour une étude par RMN). La culture se poursuit à 37°C. Lorsque la densité optique à 600 nm des cultures atteint 0,5, l'expression de la protéine SufA, SufE ou SufS est induite par ajout d'une solution d'IPTG (concentration finale = 0,5 mM). Après 3 heures d'induction à 37°C, les culots bactériens sont récupérés par centrifugation à 4000 rpm, à froid, lavés avec le tampon A (Tris-HCl 50 mM pH=7,5), et conservés à -80°C.

III-1-2- Préparation des extraits protéiques

Les culots bactériens obtenus à partir des cultures sont décongelés et remis en suspension dans le tampon B (Tris-HCl 100 mM pH=7,5, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM), puis traités aux ultrasons (10 cycles de 10 secondes). Après centrifugation à 45000 rpm, pendant 1h30 à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires, le surnageant contenant les protéines solubles est traité avec 2 % en poids de sulfate de streptomycine pendant 30 minutes à 4°C sous agitation. Une deuxième centrifugation (10000 rpm, 4°C, 30 minutes) permet alors d'éliminer l'ADN précipité. Le surnageant correspondant aux extraits protéiques solubles est prélevé et placé à 4°C.

III-1-3- Etapes chromatographiques

Toutes les étapes suivantes de purification des protéines sont réalisées à 4°C.

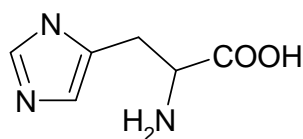
III-1-3-a- Purification des protéines SufA_{his}, SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}, SufA_{C116A}, SufE_{his} et SufS_{his}

♦ colonne d'affinité, Ni-NTA

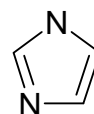
Les extraits protéiques obtenus sont chargés sur une colonne Nickel - Acide Nitrilo Triacétique (Ni-NTA) (Qiagen) maintenue à 4°C et équilibrée avec le tampon C (Tris-HCl 100 mM pH=7,5, NaCl 50 mM).

Cette étape chromatographique permet une purification aisée des protéines possédant une extension polyhistidine. Le principe de cette étape de purification repose sur l'affinité existant entre les résidus histidines contigus de la protéine et l'ion Ni^{2+} relié à la matrice de la colonne via le groupement NTA. En effet, le NTA interagit, par l'intermédiaire de 4 atomes, avec l'ion Ni^{2+} . Ce dernier possède alors encore deux sites d'interaction libres. Ainsi, lorsque la protéine (SufA, SufE, SufS ou IscA), contenant 6 résidus histidines en C-terminal ou en position N-terminale dans le cas de IscA, passe sur la colonne, des interactions entre les histidines de la protéine et l'ion Ni^{2+} se créent. La protéine se fixe alors spécifiquement sur la matrice.

Après un lavage abondant de la colonne avec le tampon C, la protéine est éluée avec le tampon D (Tris-HCl 100 mM pH=7,5, NaCl 50 mM, Imidazole 500 mM). L'imidazole présente une structure semblable à celle de l'histidine puisqu'il possède un cycle azoté. De ce fait, il possède aussi une forte affinité avec l'ion Ni^{2+} . L'utilisation d'une solution contenant de l'imidazole à forte concentration permet ainsi de déplacer l'équilibre et de décrocher la protéine.



histidine



imidazole

Figure 15 : formules chimiques de l'histidine et de l'imidazole

Les fractions récupérées sont ensuite analysées sur gel d'électrophorèse. Celles contenant la protéine désirée (SufA, SufE, SufS ou IscA suivant les extraits chargés) sont

concentrées par ultrafiltration sur une membrane Amicon (Millipore), choisie en fonction de la taille de la protéine. Après cette étape, les protéines sont pures à 80 % environ.

♦ *colonne d'exclusion stérique Superdex 75*

Cette étape de purification consiste à réaliser un tamisage moléculaire. Les différents constituants de l'échantillon sont donc séparés selon leur poids moléculaire. Le fractionnement de la Superdex75 se situe entre 3.10^3 Da et 7.10^4 Da.

La solution protéique obtenue après purification sur Ni-NTA est chargée sur une colonne Superdex 75 16/60 prep-grade (Amersham-Pharmacia Biotech, 1.6 cm*60 cm, 124 mL) équilibrée avec le tampon E (Tris-HCl 100 mM pH=7,5, NaCl 50 mM, DTT 5 mM), puis éluée avec ce même tampon à un débit de 0,8 ml/min. Des fractions de 2 mL sont collectées puis analysées sur gel d'électrophorèse. SufS est éluée à 60 minutes, SufE à 91 minutes, SufA (sauvage et mutée) à 87 minutes et IscA à 88 minutes. Celles contenant la protéine pure sont concentrées par ultrafiltration. Enfin, les échantillons sont aliquotés et stockés à -80°C . Les protéines obtenues sont pures à 95%.

III-1-3-b- Purification de la protéine SufA ne possédant pas d'étiquette polyhistidine (SufA_{STOP})

♦ *précipitation au sulfate d'ammonium*

Les extraits protéiques subissent une précipitation avec 40% de sulfate d'ammonium. Le culot obtenu (rouge) contient la protéine SufA. Celui-ci est ensuite redissout dans 10 mL de tampon F (Tris-HCl 25 mM pH=7,5).

♦ *colonne d'exclusion stérique Superdex 75*

La solution protéique obtenue est purifiée sur une colonne Superdex 75 selon le protocole décrit précédemment.

III-2- Purification de la protéine SufA à partir de l'opéron *suf*

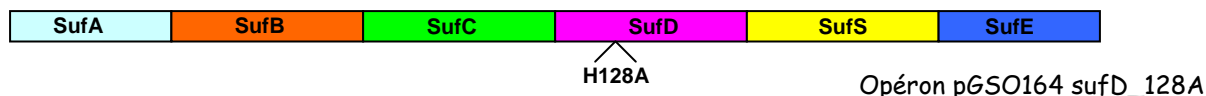


Figure 16 : représentation schématique de l'opéron *suf* ayant servi pour la purification de SufA

III-2-1- Surexpression de l'opéron *suf*

La souche *E. coli* Top10 est transformée par le plasmide pGSO164 SufD_H128A, codant pour les six protéines de l'opéron *suf*. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB-agar, contenant 100 mg/L d'ampicilline. Une préculture de 100 mL réalisée à 37°C sur la nuit sert à inoculer 5L de milieu LB/ampicilline à 1,5 %. La culture est réalisée à 37°C. Lorsque les cultures atteignent une DO_{600nm} égale à 0,6, l'expression des protéines Suf est induite par l'ajout de 0,2 % d'arabinose, pendant 3 heures. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation à 4000 rpm, à froid, des milieux de culture et conservées à -80°C.

III-2-2- Préparation des extraits protéiques

Les extraits protéiques sont préparés sous atmosphère contrôlée en réalisant des cycles de congélation/décongélation en présence de lysozyme. Typiquement, les cellules récupérées à partir de 2 L de culture sont décongelées en boîte à gants et resuspendues dans 40 mL de tampon G (Tris-HCl 25 mM pH=7,5, β -mercaptoéthanol 10 mM). 40 mg de lysozyme sont ajoutés. Après 30 minutes d'incubation, sous agitation, les cellules subissent trois cycles de congélation/décongélation afin de casser les membranes cellulaires et extraire les protéines solubles. Celles-ci sont récupérées après une centrifugation à 45000 rpm, pendant 1h, à 4°C, permettant d'éliminer les débris cellulaires.

III-2-3- Chromatographie : échange d'anions

La purification de la protéine SufA est ensuite réalisée en boîte à gants à température ambiante. Cette étape expérimentale est très délicate d'un point de vue pratique et doit être rapide pour tenter de conserver le centre métallique de la protéine que l'on sait peu stable. Les extraits protéiques sont chargés sur une colonne échangeuse d'anions Q-sépharose Fast Flow équilibrée avec le tampon G. Après un lavage abondant de la colonne (environ 8 volumes de colonne) avec ce même tampon, la plupart des protéines sont éluées grâce à un gradient linéaire de 0 à 40 % de tampon H (tampon G contenant NaCl 1 M), avec un débit de 1 mL/min. Le reste des protéines est décroché en lavant la colonne avec 100 % de tampon H. Les fractions récupérées sont analysées par gel d'électrophorèse. Celles contenant la protéine SufA, sont rassemblées, concentrées et stockées à -80°C. La pureté de la protéine obtenue est d'environ 95 %.

III-3- Purification de la ferrédoxine

La culture de la ferrédoxine [2Fe-2S] d'*E. coli* a été réalisée selon le protocole décrit par Nakamura et coll (Nakamura *et al.*, 1999). La culture est tout d'abord réalisée à 37°C, puis l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM) pendant une nuit à 30°C afin d'éviter l'agrégation de la ferrédoxine sous forme de corps d'inclusion. Les extraits ont ensuite été préparés par sonication. La purification se déroule selon trois étapes chromatographiques (deux colonnes échangeuses d'anions et une colonne d'exclusion stérique), comme décrit précédemment (Ta and Vickery, 1992).

IV- Méthodes biochimiques

IV-1- Préparation de la protéine SufA chargée en soufre

Les expériences sont réalisées en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (<4 ppm O₂), à 19°C. Deux méthodes ont été utilisées afin d'obtenir la forme soufrée de la protéine SufA, nommée par la suite SufA-SSH.

♦ *Conditions « stoechiométriques » (méthode 1)*

Il faut tout d'abord préparer la forme soufrée du complexe SufSE. Pour cela, les protéines SufS et SufE (solution préparée à 300 μ M pour chacune des deux protéines) sont incubées en présence de cystéine (4 mM) dans du tampon A (Tris-HCl 50 mM pH=7,5), pendant 30 minutes. La solution est ensuite déposée sur une colonne de dessalage Micro Bio-spin 6 (Biorad) équilibrée avec le même tampon afin d'éliminer l'excès de cystéine et ainsi de stopper la réaction. Dans ces conditions, SufSE est soufré (ce qui a été vérifié par spectrométrie de masse) ; cette forme sera nommée par la suite SufSE-SSH. 2 excès molaires par rapport au complexe SufSE d'une solution protéique de SufA sont ensuite ajoutés. Après 30 minutes d'incubation, pendant laquelle le soufre est transféré de SufSE à SufA, la réaction est arrêtée par congélation de l'échantillon dans l'azote liquide.

♦ *Conditions « catalytiques » (méthode 2)*

Cette deuxième méthode consiste à utiliser des quantités catalytiques de SufSE. Une solution contenant SufA (200 μ M), SufS (6 μ M), SufE (6 μ M) et un excès de cystéine (10 mM) est préparée. Après 3 heures de réaction à 37°C, la solution est dessalée sur une colonne Micro Bio-spin 6 équilibrée avec le tampon A, puis congelée dans l'azote liquide.

Quelles que soient les conditions de réaction utilisées (méthodes 1 ou 2), les échantillons protéiques obtenus sont ensuite analysés par spectrométrie de masse afin de vérifier le transfert de soufre sur SufA.

IV-2- Digestion enzymatique de la protéine SufA

Afin de déterminer la localisation du soufre fixé au sein de la protéine SufA, la forme soufrée de la protéine (notée SufA-SSH) a été digérée. Pour cela, 0,5 μ g/ μ L d'endoprotéinase Lys-C (Roche Diagnostics GmbH) sont ajoutés à un échantillon de SufA à 5 μ g/ μ L. La réaction de digestion est maintenue 18 heures à température ambiante. L'échantillon est alors analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

IV-3- Alkylation de la protéine SufA apo et soufrée (SufA-SSH)

Afin d'inactiver les cystéines de SufA, nous avons utilisé un agent alkylant, l'iodoacétamide. 15 à 25 excès molaires d'une solution d'iodoacétamide sont ajoutés à la

protéine, apo ou soufrée, et la réaction est maintenue 1 à 3 heures à température ambiante, dans l'obscurité. L'excès d'iodoacétamide est ensuite éliminé en dessalant les protéines sur une colonne Micro Bio-spin (Biorad). Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant d'être analysés par spectrométrie de masse.

IV-4- Etude d'interactions entre SufA et SufS/SufE par chromatographie d'affinité

Les protéines SufS, SufE et SufSE (1mg), possédant une étiquette polyhistidine, sont chargées, chacune, sur une colonne d'affinité, Nickel Chelating Sepharose (GE Healthcare) équilibrée avec le tampon I (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, NaCl 150 mM). La protéine SufA_{STOP} (1 mg), ne comportant pas d'étiquette polyhistidine, est alors chargée, à son tour, sur ces colonnes. Ces dernières sont lavées abondamment (15 volumes de colonne) avec le tampon I contenant 20 mM d'imidazole, puis éluées avec le tampon I contenant 500 mM d'imidazole. Les fractions récupérées après lavage et élution des colonnes sont analysées par gel d'électrophorèse. Si SufA est retrouvée dans les fractions obtenues après élution, cela signifie qu'elle interagit avec la protéine chargée sur la colonne, sachant qu'il a été vérifié, au préalable, que SufA_{STOP} seule n'interagit pas avec le gel de la colonne.

IV-5- Préparation de la protéine SufA chargée en fer

Les réactions sont réalisées en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (<4 ppm O₂), à 18°C. 100 µL d'une solution de SufA préparée à 500 µM dans le tampon J (Tris-HCl 100 mM pH8, KCl 50 mM) sont traités avec du DTT (3 mM) pendant 10 minutes. Différents excès molaires (2, 4 ou 8 excès molaires) par rapport à SufA de Fe²⁺ introduit sous forme d'une solution de sel de Mohr [Fe(NH₄)₂(SO₄)₂] sont ajoutés. Après 30 minutes de réaction, la solution est déposée sur une colonne de dessalage NAP10 (Amersham) équilibrée avec le tampon J. La protéine SufA, débarrassée de l'excès de fer, est récupérée et analysée spectroscopiquement (UV-visible) et biochimiquement (contenu en fer).

Pour l'analyse par spectroscopie Mössbauer, SufA (750 µM) a été incubée avec 4 excès molaires de ⁵⁷Fe(II) en présence de DTT (4 mM) pendant 90 minutes, puis dessalée sur une colonne NAP10. La solution protéique est ensuite concentrée à 660 µM sur une membrane Amicon YM 10, puis introduite dans une cellule Mössbauer de 400 µL et congelée en boîte à gants dans du 2-méthyl butane (Acros) refroidi par l'azote liquide.

IV-6- Préparation de la protéine IscA chargée en fer

Afin de comparer le comportement de SufA et de IscA, nous avons également préparé et étudié la protéine IscA chargée en fer, soit suivant le protocole présenté ci-dessus pour SufA, soit suivant le protocole décrit précédemment par Ding et coll.(Ding *et al.*, 2004). IscA est tout d'abord incubée pendant 2 heures avec un excès de DTT (10 mM) et d'EDTA (10 mM), puis dessalée, afin d'éliminer toute trace de fer fixé à la protéine. IscA (50 μ M) est ensuite traitée, en conditions aérobies, avec différents excès de Fe(II) introduit sous forme de sel de Mohr, en présence d'un excès de DTT (2 mM), pendant 5 minutes, puis purifiée sur colonne NAP10 avant d'être analysée spectroscopiquement (UV-visible) et biochimiquement (contenu en fer).

IV-7- Reconstitution chimique du centre [Fe-S] dans SufA

La reconstitution est réalisée en boîte à gants sous atmosphère contrôlée ($O_2 < 4$ ppm), à 18°C. La protéine SufA, purifiée sous forme apo, (environ 15 mg/mL), est incubée 10 minutes en présence de DTT 5 mM. 1 à 4 excès molaires par rapport à SufA de S^{2-} introduit sous forme d'une solution de sulfure de sodium (Na_2S dans H_2O), puis 1 à 4 excès molaires de Fe^{2+} introduit sous forme d'une solution de sel de Mohr $[Fe(NH_4)_2(SO_4)_2]$ sont ajoutés. Après un temps d'incubation variable suivant les expériences (de 5 minutes à 1 nuit), la solution est déposée sur une colonne NAP10 (Amersham), équilibrée avec le tampon J. La protéine, de coloration marron, débarrassée de l'excès de fer et de soufre, est récoltée, puis concentrée sur une cellule YM 10 (Amicon). Un spectre d'absorption UV-visible et un dosage de fer sont réalisés à la fin de chaque reconstitution.

Dans le cas où l'échantillon doit être analysé par spectroscopie Mössbauer, la solution de fer utilisée est une solution de sel de Mohr $[^{57}Fe(NH_4)_2(SO_4)_2]$, ou une solution de chlorure de fer $[^{57}FeCl_3]$ préalablement réduite avec un excès de DTT.

IV-8- Préparation de la forme apo de la ferrédoxine

La ferrédoxine $[2Fe-2S]$ d'*E. coli* (notée Fdx) obtenue après purification est traitée avec un excès de DTT (10 mM) et d'EDTA (10 mM) pendant 3 minutes à 95°C, puis purifiée sur colonne NAP10. La protéine est alors analysée spectroscopiquement et biochimiquement afin de vérifier qu'elle ne contient plus de centre [Fe-S].

IV-9- Transfert du cluster [Fe-S] de holoSufA à apoFdx

La réaction est réalisée en conditions anaérobies ($O_2 < 4$ ppm). La ferrédoxine (150 μ M) sous forme apo a été incubée avec holoSufA, obtenue après reconstitution chimique ou après purification en anaérobiose. Dans chaque cas, holoSufA a été préalablement caractérisée par son contenu en fer et en soufre, puis introduite de façon à apporter 2 à 3 excès molaires de fer et de soufre par rapport à la ferrédoxine. Après un temps d'incubation variable à 18°C, dans le tampon J (Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM), l'échantillon est réduit par un excès de dithionite (2 mM) pendant 30 minutes et le transfert du cluster est contrôlé par spectroscopie RPE. Si un transfert a eu lieu, on doit observer un centre $[2Fe-2S]^{1+}$ au sein de la ferrédoxine, celui-ci étant caractérisé par un signal de spin $S=1/2$ et centré à $g=2$. Le centre [Fe-S] de SufA est instable à la réduction. Ainsi, le signal observé en RPE ne peut provenir que de la ferrédoxine ; si aucun signal RPE n'apparaît, cela signifie que le transfert du cluster n'a donc pas eu lieu. Dans certains cas, les deux protéines, après incubation, sont tout d'abord séparées sur colonne d'affinité NiNTA, selon un protocole similaire à celui décrit dans le paragraphe IV-4, seule SufA possédant une étiquette polyhistidine et interagissant avec le gel de la colonne. La fraction contenant la ferrédoxine a pu être alors caractérisée par spectroscopie UV-visible et par son contenu en fer et en soufre avant d'être réduite et analysée par spectroscopie RPE.

IV-10- Préparation de la forme apo de la Spore Photoproduit Lyase

La Spore Photoproduit Lyase (SPL) purifiée nous a été fournie par Alexia Chandor au laboratoire (Chandor *et al.*, 2006). La protéine est ensuite traitée avec un excès de DTT (10 mM) et d'EDTA (10 mM) pendant une nuit à 4°C, puis purifiée sur colonne NAP10. La protéine est alors analysée spectroscopiquement et biochimiquement afin de vérifier qu'elle ne contient plus de centre [Fe-S].

IV-11- Transfert du cluster de holoSufA à apoSPL

La réaction est réalisée en conditions anaérobies ($O_2 < 4$ ppm). La spore photoproduit lyase (150 μ M) sous forme apo a été incubée avec holoSufA (sauvage ou mutante), obtenue après reconstitution chimique. Dans chaque cas, holoSufA a été préalablement caractérisée par son contenu en fer et en soufre, puis introduite de façon à apporter 5 excès molaires de fer

et de soufre par rapport à la spore photoproduct lyase (SPL). Après un temps d'incubation variable à 18°C, dans le tampon J (Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM), le transfert du cluster est contrôlé en mesurant l'activité enzymatique spécifique de la SPL, celle-ci dépendant de la présence du centre [4Fe-4S] au sein de la protéine. Si aucune activité n'est mesurée, cela signifie que le transfert du cluster n'a pas eu lieu. Le test d'activité de la SPL a précédemment été décrit par Chandor et coll. (Chandor *et al.*, 2006). Typiquement, le mélange réactionnel est préparé comme suit : l'échantillon protéique obtenu après réaction de transfert et contenant la SPL (1 µM) est incubé pendant 1 heure à 37°C en présence du substrat de la SPL, le SpTpT (10 µM), de S-adénosylméthionine (1,5 mM), de DTT (2,5 mM) et de dithionite (1,5 mM), dans un volume final de 20 µL contenant le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 200 mM. La disparition du substrat de l'enzyme et l'apparition du produit de la réaction dans les échantillons sont mesurées par HPLC couplée à la spectrométrie de masse selon le protocole décrit par Chandor et coll. (Chandor *et al.*, 2006). De fait, on mesure la concentration (en µM) du produit (TpT) et du substrat (SpTpT) en fin de réaction. Dans certains cas, la réaction de transfert du cluster a été réalisée à partir de la protéine SufA_{STOP}. Les deux protéines, SufA_{STOP} et la spore photoproduct lyase (comportant une étiquette polyhistidine), après incubation, ont pu alors être séparées sur colonne d'affinité NiNTA. La fraction contenant la SPL a pu être ainsi caractérisée par spectroscopie UV-visible et par son contenu en fer et en soufre avant d'être caractérisée par son activité enzymatique.

V- Analyses biochimiques

V-1- Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), à l'aide de la solution commerciale "Biorad Protein Assay" (Biorad). Cette technique est basée sur le changement de coloration à 595 nm du bleu de Coomassie, qui passe du rouge au bleu en se fixant aux protéines. La concentration d'un échantillon est donc déterminée par simple lecture de l'absorbance à 595 nm dont la valeur est comparée avec celles obtenues à partir d'une solution d'Albumine Sérique Bovine (BSA) de concentration connue et constituant la droite d'étalonnage.

V-2- Dosage du fer dans les protéines

Le dosage du fer est effectué selon une méthode dérivée de la méthode de Fish (Fish, 1988).

Une gamme d'étalonnage est tout d'abord réalisée afin de pouvoir déterminer ensuite la quantité de fer présente dans un échantillon protéique.

♦ Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de Fe(II) commerciale (Aldrich), dont la concentration est ajustée à 500 μM . Ainsi, 1 μL de cette solution contient 0,5 nmole de fer. Des eppendorfs contenant différentes quantités de fer sont préparés comme décrit dans le tableau 9, en ajustant le volume à 65 μL avec de l'eau.

nmoles de Fe^{2+}	solution de Fe^{2+} à 500 μM (μL)	eau (μL)
0	0	65
2	4	61
4	8	57
6	12	53
8	16	49
10	20	45

Tableau 9 : gamme étalon pour le dosage du fer dans les protéines.

Chaque étalon est alors traité de la façon suivante :

- 45 μL de PCA sont ajoutés et la solution est mélangée énergiquement.
- Les tubes sont laissés 15 minutes à température ambiante. A 90 μL de chacun des échantillons sont ajoutés :
 - 72 μL de bathophénantroline disulfate à 1,7 mg/ml. Il s'agit d'un chélateur de fer.
 - 36 μL d'ascorbate de sodium à 38 mg/ml. Ce produit est un réducteur qui permet de mettre tout le fer présent en solution sous forme de Fe(II).
 - 27 μL d'acétate d'ammonium saturé (dilué 3 fois). La solution est agitée vigoureusement. Une couleur rose apparaît immédiatement, mais on laisse la réaction se poursuivre pendant 30 minutes à température ambiante. En effet, l'acétate d'ammonium neutralise le milieu. Dans cette gamme de pH, le complexe formé entre le fer et la bathophénantroline est rose. La couleur de la solution est plus ou moins prononcée selon la quantité de fer présente dans l'échantillon.

La mesure de l'absorbance à 535-680 nm est effectuée pour chaque échantillon. La gamme d'étalonnage est obtenue en portant l'absorbance à 535-680 nm en fonction du nombre de nanomoles de fer.

♦ *Echantillon protéique*

Des échantillons de concentration connue en protéine et ayant un volume final de 65 μL sont préparés. 45 μL de PCA sont ajoutés, ce qui provoque la dénaturation des protéines. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions sont centrifugées à 10000 rpm pendant 5 minutes, afin d'éliminer les protéines précipitées. 90 μL du surnageant sont récupérés puis traités de la même façon que les étalons. La lecture de l'absorbance à 535-680 nm permet de déterminer la quantité de fer présente dans la protéine.

V-3- Dosage du soufre dans les protéines

Le soufre a été dosé selon la méthode colorimétrique décrite par Beinert (Beinert, 1983).

♦ *Gamme d'étalonnage*

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de sulfure de sodium (Na_2S) dont la concentration est ajustée à 200 μM . Des échantillons contenant des quantités déterminées de sulfure (0-10 nmoles) sont préparés comme décrit dans le tableau 10, en ajustant le volume à 100 μL avec de l'eau.

nmoles de S^{2-}	solution de Na_2S à 200 μM (μL)	eau (μL)
0	0	100
1	5	95
5	25	75
10	50	50
20	100	0

Tableau 10 : gamme étalon pour le dosage de soufre dans les protéines.

Chaque tube est alors traité de la façon suivante :

- 300 μL d'acétate de zinc [$\text{Zn}(\text{OAc})_2$, H_2O] à 1% (solution à 100 mg/mL diluée au 1/10^{ème}) sont ajoutés, immédiatement suivis de l'addition de 15 μL de soude (NaOH) 3N. La solution est mélangée vigoureusement. Cette procédure permet d'éviter la perte de soufre sous

forme de H_2S qui se produit lors de l'acidification du milieu par ajout de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$. Le mélange est laissé à température ambiante entre 5 et 10 minutes.

- Ensuite, 75 μL de DiMéthyl Phénylène Diamine (DMPD) 0,01% (solution à 1 mg/mL dans HCl 5N) sont ajoutés, immédiatement suivis de l'addition de 16 μL d'une solution de chlorure de fer (FeCl_3) à 23 mM (37,5 mg dans 10 mL HCl 1,2 N). De même que précédemment la solution est mélangée énergiquement. Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 30 minutes. Une coloration bleue apparaît. Elle correspond à la formation du bleu de méthylène, obtenu par réaction des ions sulfures S^{2-} avec le DMPD en milieu oxydant. Cette coloration est plus ou moins prononcée suivant la quantité de soufre présente dans l'échantillon.

- Chaque tube est alors centrifugé (10000 rpm, 5 minutes) et l'absorbance à 670 nm mesurée. La gamme d'étalonnage est obtenue en portant l'absorbance à 670 nm en fonction du nombre de nanomoles de soufre.

♦ *Echantillons protéiques*

De la même façon, l'ensemble des réactifs cités précédemment est ajouté à 100 μL d'une solution protéique de concentration connue. Dans ce cas, l'incubation de l'échantillon avec le DMPD et le chlorure de fer est réalisée à froid (4°C) pendant 3 heures. Le reste du dosage est identique. La mesure de l'absorbance à 670 nm permet de déterminer la quantité de soufre initialement présente dans la protéine.

V-4- Electrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées dans un champ électrique. Cette technique est utilisée pour séparer les différentes protéines présentes dans un échantillon. L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes : 5 à 20 μg de protéines sont dénaturées par chauffage à 100°C dans du tampon de dénaturation (Tris- HCl 1M pH=6,8, SDS 10 %, glycérol 15 %, BBP 2 %, β -mercaptoéthanol 2 %). Le β -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures, ôtant ainsi la structure tridimensionnelle aux protéines, alors que le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un détergent qui rompt les interactions inter et intra-protéiques et qui se fixe sur les protéines en les chargeant négativement. La charge propre de chaque protéine devient ainsi négligeable. Les protéines migrent donc selon leur poids moléculaire et non leur charge.

Les échantillons protéiques dénaturés sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. La concentration en polyacrylamide dépend de la masse des protéines d'intérêt : plus elles sont petites, plus le gel devra être concentré. Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de séparation surmonté d'un gel de concentration (voir compositions dans le tableau 11). Ce dernier permet une migration homogène des protéines qui vont donc se tasser au sommet du gel de séparation, afin de garantir la pénétration simultanée de toutes les protéines de l'échantillon dans ce gel. Les protéines vont ensuite migrer lors du passage d'un courant électrique de 200 V et 35 mA pendant environ 60 minutes. Le gel joue un rôle de tamis moléculaire, séparant les protéines selon leur masse. La masse apparente des protéines est évaluée grâce au calibrage du gel par des protéines de poids moléculaire connu. Les bandes correspondant aux protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,25 %, méthanol 45 %, acide acétique 10 %, glycérol 10 %) puis décoloration dans une solution méthanol 30 %, acide acétique 10 %, glycérol 5 %.

Constituants	Gel de séparation 15 %	Gel de concentration
Acrylamide/Bisacrylamide	3 mL	0,85 mL
Tris-Base 1 M pH=8,8	1,8 mL	---
Tris-HCl 1 M pH=6,8	---	0,78 mL
Glycérol 50 %	1,2 mL	---
Eau distillée	---	3,4 mL
SDS 10 %	60 µL	50 µL
APS	30 µL	25 µL
TEMED	4 µL	4 µL

Tableau 11 : composition des gels de séparation et de concentration

VI- Techniques physico-chimiques

VI-1- Spectrophotométrie UV-visible

◆ Principe :

L'absorption d'un photon peut permettre à une molécule ou un atome de passer de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 , par passage d'un électron d'une orbitale à une autre. L'énergie d'un photon absorbé lors d'une transition entre deux niveaux d'énergie est donnée par la relation $e = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon ($\nu = 1/\lambda$ avec

λ correspondant à la longueur d'onde). En solution, seules les transitions électroniques de faible énergie sont observables, c'est-à-dire les bandes d'absorption dans l'ultraviolet proche et dans le visible. Chaque bande d'absorption est caractérisée par la longueur d'onde du maximum d'absorption, λ_{max} , et par son intensité, donnée par la valeur du coefficient d'extinction molaire (ϵ) à la longueur d'onde considérée. Ces grandeurs sont reliées à la concentration du soluté en solution par la loi de Beer-Lambert $A(\lambda) = \epsilon(\lambda).l.[C]$ où A est l'absorption, l la longueur du trajet optique et $[C]$ la concentration.

♦ *Informations obtenues :*

Les molécules biologiques qui absorbent sont celles qui possèdent des doubles liaisons conjuguées, des noyaux aromatiques et celles qui contiennent un métal de transition. Ainsi, le pic d'absorption à 280 nm observé pour les solutions protéiques correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. Dans le cas des protéines [Fe-S], le transfert de charge du soufre vers le fer(III) provoque une absorption entre 300 et 600 nm. Cette valeur varie en fonction du type d'agrégat fer-soufre et même si ces bandes d'absorption sont relativement larges, la position de leur maximum ainsi que la forme générale du spectre fournissent des renseignements sur la nature du centre [Fe-S].

♦ *Mise en œuvre :*

Les spectres d'absorption ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. Les études en aérobiose ont été réalisées avec un spectrophotomètre Cary1 Bio (Varian), et les spectres en conditions anaérobies ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Uvikon XL (Bio-Tek instruments) relié par des fibres optiques à la cuve placée à l'intérieur de la boîte à gants.

VI-2- Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

♦ *Principe :*

La spectroscopie RPE permet d'étudier les espèces dites paramagnétiques qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés. L'entité paramagnétique est placée dans un champ magnétique H variable et reçoit une onde électromagnétique d'énergie $h\nu$. Lorsque l'énergie $h\nu$ de l'onde est égale à l'énergie nécessaire pour permettre la transition entre deux états de spin de l'électron, il se produit le phénomène de résonance paramagnétique

électronique. L'énergie de transition est égale à $g\beta H$, où g correspond au facteur de Landé ($g_e = 2,0023$ pour l'électron libre) et β au magnéton de Bohr. L'électron non apparié dans une orbitale moléculaire possède un facteur g dont la valeur diffère de celle de g_e en fonction du centre paramagnétique et de son environnement moléculaire. Le facteur g est anisotrope, ce qui signifie qu'il est assimilable à une grandeur tensorielle définie par trois composantes g_x , g_y et g_z . Ces trois composantes correspondent aux points d'inflexions et à l'extremum du spectre d'absorption enregistré au cours du balayage des valeurs du champ magnétique.

En fait, le spectre obtenu expérimentalement est la dérivée du signal d'absorption pour laquelle la détermination des valeurs de g est plus précise.

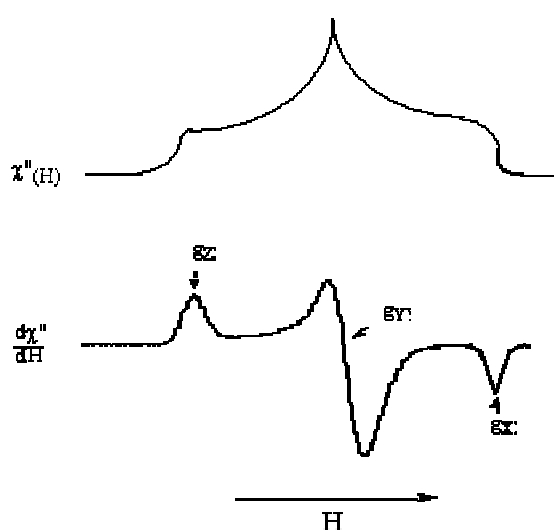


Figure 17 : Signal d'absorption χ'' et sa dérivée $d\chi''/dH$ obtenus en faisant varier le champ H . La dérivée du signal d'absorption permet de déterminer les grandeurs tensorielles g_x , g_y et g_z qui sont caractéristiques du centre paramagnétique étudié.

♦ Informations obtenues :

Appliquée à l'étude des centres [Fe-S], la RPE nous informe sur le type de centre, son état rédox et sa quantité puisque le signal peut être intégré et la valeur de l'intégration comparée à celle d'une solution standard de concentration connue.

♦ Mise en œuvre :

Les mesures ont été effectuées sur des échantillons de 200 μL de protéine à une concentration d'environ 150 μM , préparés et congelés dans la boîte à gants. Les spectres RPE ont été enregistrés grâce à un spectromètre Bruker ESP 300E à température variable équipé

d'un cryostat (Oxford Instruments) qui permet d'atteindre la température de l'hélium liquide. Les quantifications du signal des centres [Fe-S] ont été réalisées par comparaison avec les valeurs obtenues pour une solution standard de Cu-EDTA à 1 mM.

VI-3- Spectroscopie Mössbauer

La spectroscopie Mössbauer ou spectroscopie d'absorption γ est l'étude de l'absorption nucléaire résonante de rayons γ par certains noyaux. Ce phénomène se produit lorsqu'un photon γ , émis par un noyau émetteur lors de la désexcitation de ce noyau (qui passe donc d'un niveau excité E_e à l'état fondamental E_f) est absorbé par un noyau identique se trouvant dans l'état fondamental. Le noyau absorbant est alors excité au niveau d'énergie E_e .

Dans notre cas, la source de rayonnement γ est obtenue par désintégration radioactive de l'isotope $^{57}\text{Co}^*$. Celui-ci se convertit lentement par capture électronique en un état excité noté $^{57}\text{Fe}^*$. Dans un délai de l'ordre de la microseconde, le $^{57}\text{Fe}^*$ revient à l'état fondamental par l'émission d'une radiation électromagnétique de haute fréquence dans la région des énergies γ .

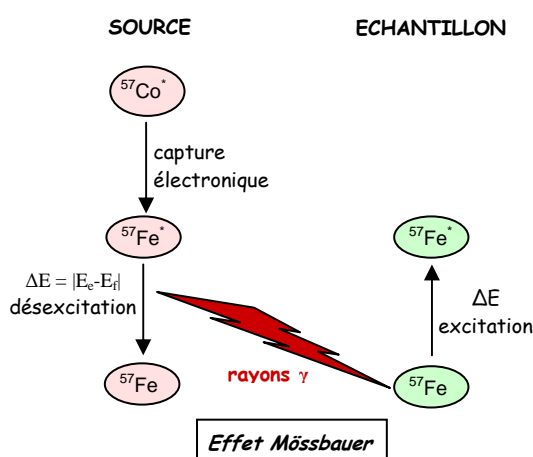


Figure 18 : Principe de l'effet Mössbauer

Si les noyaux de l'échantillon se trouvent dans un environnement différent de celui de la source, la modification de l'environnement électronique des noyaux produit un effet suffisant sur les niveaux d'énergie nucléaires pour que l'absorption n'ait plus lieu. Pour rétablir la résonance, la fréquence des rayons γ doit être modifiée. Cette variation est obtenue

en déplaçant la source à une vitesse relative v par rapport à l'absorbant. Ceci conduit à un balayage approprié du spectre de fréquences γ susceptibles d'être captées par l'échantillon absorbeur. C'est le principe de l'effet Doppler. En spectroscopie mössbauer, les énergies sont donc exprimées en unités de vitesse et les vitesses requises sont généralement de l'ordre du mm/s. Ainsi, les spectres mössbauer indiquent la transmission relative des rayons γ ayant traversé l'échantillon en fonction de la vitesse relative de la source par rapport à l'absorbant.

En spectroscopie mössbauer, l'absorption des rayons γ est caractérisée par trois paramètres. Ceux-ci correspondent à différentes interactions hyperfines qui sont dues aux perturbations créées par l'environnement du noyau absorbeur.

L'interaction monopolaire électrique : paramètre de déplacement isomérique δ

Le noyau absorbeur se trouvant dans un environnement différent de celui de la source, le pic d'absorption est décalé par rapport à la raie d'émission d'une quantité δ (exprimé en mm/s) appelée déplacement isomérique. δ provient de l'existence d'interactions entre la distribution de charge nucléaire supposée sphérique et la densité de charge électronique contenue dans le volume nucléaire. δ reflète donc la structure électronique et fournit par conséquent des informations sur l'état d'oxydation, le degré de covalence et la nature des ligands de l'atome absorbeur (ici le ^{57}Fe).

L'interaction quadripolaire électrique : paramètre d'éclatement quadripolaire ΔE_q

Cette interaction est due à l'asymétrie de la distribution de charges qui entoure le noyau, créant un gradient de champ électrique. Le noyau dans un état de spin $I > 1/2$ possède un moment quadripolaire électrique Q . L'interaction de ce dernier avec le gradient de champ électrique (appelée interaction quadripolaire électrique) provoque une levée de dégénérescence de l'état excité, conduisant à deux niveaux séparés de ΔE_q , défini comme l'éclatement quadripolaire exprimé en mm/s. Ce paramètre reflète la symétrie de la distribution électronique autour du noyau considéré.

L'interaction dipolaire électrique : paramètre de champ magnétique effectif ΔE_m

Pour l'étude de nos échantillons, ce paramètre n'intervient pas. Toutefois, il est intéressant de noter qu'une interaction peut exister entre le moment magnétique nucléaire du noyau résonant avec le champ magnétique créé par l'environnement électronique du noyau auquel peut s'ajouter une induction magnétique extérieure. Elle renseigne sur la cristallinité du solide étudié.

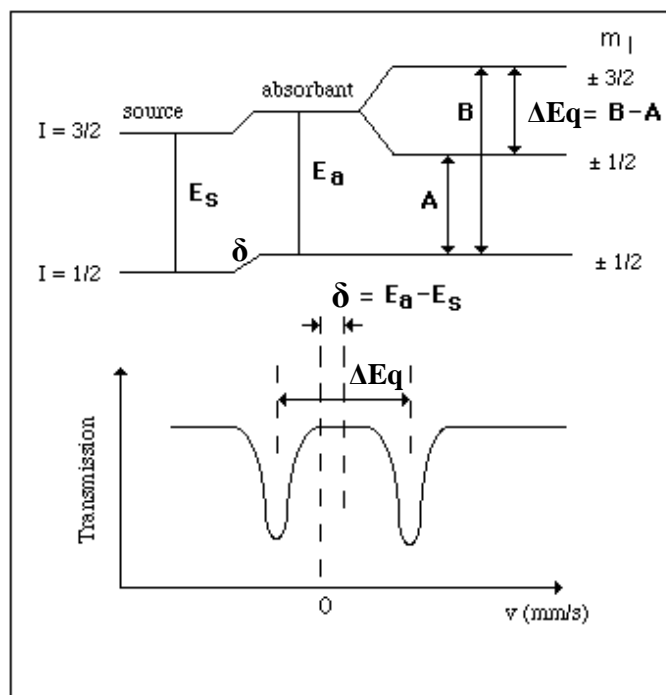


Figure 19 : déplacement isomérique δ et éclatement quadripolaire ΔE_q des composés du ^{57}Fe ; schématisation des spectres Mössbauer résultants

VI-4- Spectrométrie de masse

◆ Principe :

Par définition, la spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux, et d'obtenir leur masse moléculaire m en analysant leur rapport masse/charge noté m/z , où m est la masse du composé et z sa charge.

Bien qu'il existe plusieurs techniques de spectrométrie de masse, l'appareil utilisé est toujours constitué des parties suivantes :

- une source d'ions
- un ou plusieurs filtres de masse
- un détecteur
- un enregistreur pour traiter le signal et visualiser les spectres

Deux types de spectromètre ont été utilisés : le spectromètre ESI-Q-TOF et le spectromètre MALDI-TOF.

• le spectromètre ESI-Q-TOF

La source ESI (Electrospray Ionization)

Un échantillon de protéines est mélangé à un solvant volatil (acide), puis introduit dans un capillaire métallique très fin (50 à 100 μM de diamètre interne). Celui-ci est porté à un haut potentiel électrique (10^6 V/m), sous un flux d'azote à haute température. Ceci provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui sont attirées dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Pendant ce transport, la désolvatation progressive des gouttelettes par l'azote gazeux induit une série d'explosions coulombiennes (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée) qui est à l'origine de la formation des ions multichargés en phase gazeuse.

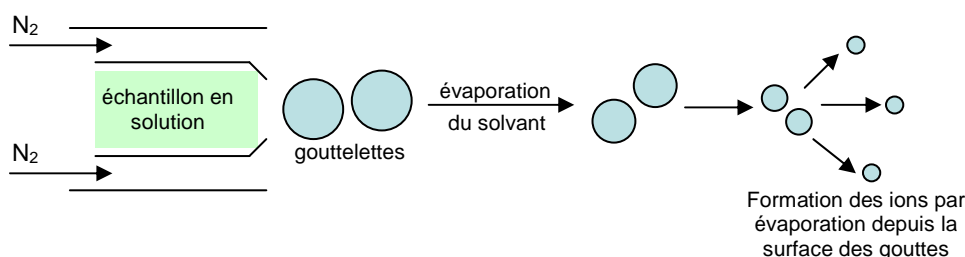


Figure 20 : principe du système d'ionisation électrospray

L'étape suivante est la séparation des ions générés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Celle-ci se déroule au sein de l'analyseur, placé sous vide via une interface. Pour cela, deux techniques sont couramment utilisées : l'analyseur quadripolaire (Q) et l'analyseur temps de vol (TOF : Time of Flight). Il est intéressant de noter que sur les spectromètres de dernière génération, ces deux outils sont couplés (Q-TOF).

L'analyseur quadripolaire : il est formé de quatre électrodes couplées deux à deux où sont appliquées une tension alternative superposée à une tension continue. Les deux couples d'électrodes permettent d'acheminer les ions jusqu'au détecteur. Les électrodes balayent des gammes de tensions. Ce balayage permet de sélectionner les ions qui entrent en résonance avec la fréquence de la tension alternative. Pour les autres ions, leur amplitude d'oscillation croît exponentiellement. Ils se cognent contre les électrodes et n'atteignent pas le détecteur.

L'analyseur temps de vol : il s'agit d'un tube, libre de champs, qui achemine les ions jusqu'au détecteur. À l'entrée du tube, une même énergie cinétique ($E_c = 1/2 mv^2$) est donnée à tous les

ions. Or, le temps mis par un ion pour parcourir le tube de vol dépend de son rapport m/z . Si deux ions portent la même charge, l'ion le plus léger arrive au détecteur avant l'ion le plus lourd.

Dans le cas d'un appareil de type ESI-Q-TOF, l'échantillon est ionisé par une source électrospray, puis analysé avec un spectromètre de masse hybride Q-TOF.

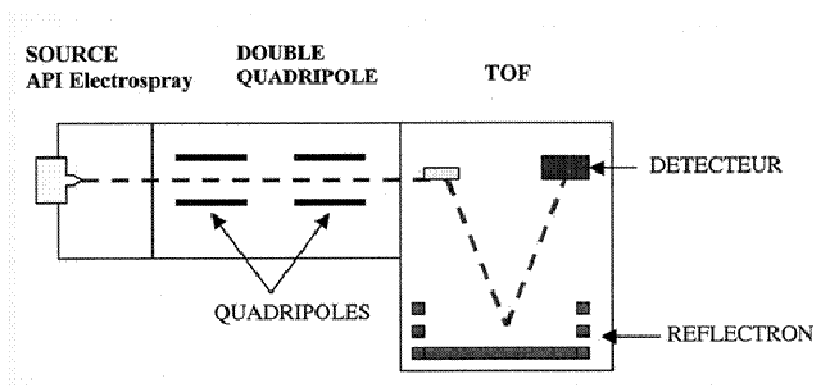


Figure 21 : spectromètre Q-TOF couplé à une source électrospray (ESI-Q-TOF)

♦ Le spectromètre MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)-TOF

Une autre technique de ionisation a été utilisée, il s'agit du MALDI. Dans ce cas, 1 volume de solution protéique est mélangé avec 1 volume de solution matrice, acide. Après séchage, la matrice cristallisée est irradiée par un faisceau laser de haute énergie ($\lambda=337$ nm). Celle-ci est transmise à l'échantillon qui est ionisé, puis désorbé. Généralement, cette méthode génère des ions mono-chargés, parfois di-chargés. Les peptides chargés sont ensuite analysés par un analyseur TOF.

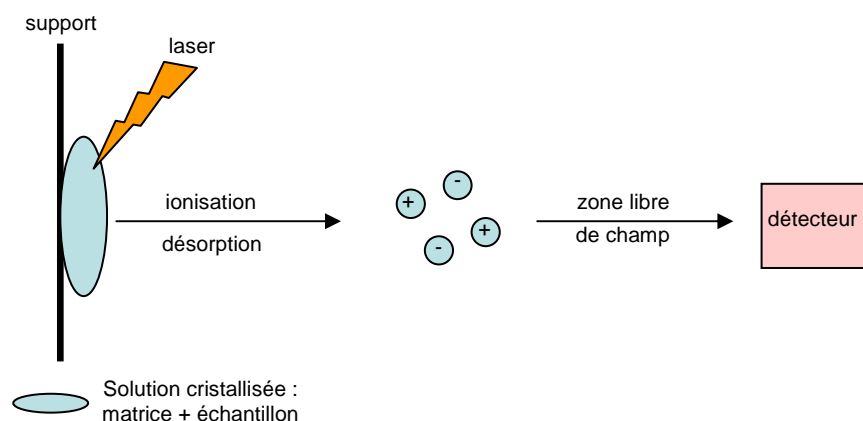


Figure 22 : principe de la spectrométrie MALDI

♦ *Informations obtenues :*

La spectrométrie de masse nous informe sur la masse d'une protéine, sa pureté (présence ou non de protéines contaminantes). Elle permet également de déterminer la nature et le nombre d'éventuels atomes fixés sur la protéine (par exemple, fixation de n atomes de soufre fixés de façon covalente à la protéine SufA).

♦ *Protocole expérimental :*

Toutes les expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées en collaboration avec David Lascoux du laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines dirigé par Eric Forest (LSMP/IBS/Grenoble).

La spectrométrie **ESI-Q-TOF** a été réalisée sur un spectromètre Q-TOF (Waters). Dans ce cas, deux modes d'analyse ont été utilisés.

Pour les expériences en mode *Infusion*, les échantillons protéiques sont dilués à 500 nM dans un mélange eau/acétonitrile (1/1, v/v) contenant 0,2% d'acide formique. Ils sont ensuite injectés en continu à un flux de 5 μ L/min. Les spectres de masse sont acquis dans une gamme de 700-1600 (m/z), puis traités avec le logiciel MassLinx 4.0 (Waters).

Pour les expériences en mode *LC-MS*, le spectromètre est couplé à une colonne chromatographique (Poroshell 300SB-C8, 0,5x75 mm 5 μ Agilent technologies). Les échantillons protéiques sont dilués à 1 μ M environ dans une solution contenant 0,2% d'acide formique. 5 μ L de chaque échantillon ainsi préparé sont injectés à un flux continu de 20 μ L/min et lavés pendant 50 minutes toujours avec le même tampon (0,2 % d'acide formique) pour éliminer les sels. Les protéines sont ensuite éluées à un flux de 10 μ L/min et séparées avec le gradient suivant : 5% à 95% de B pendant 10 minutes et 95% B pendant 5 minutes. (A : 0,2% acide formique, B : 90% acétonitrile et 10% A). Les spectres de masse sont acquis dans une gamme de 500-2000 (m/z), puis traités avec le logiciel MassLinx 4.0 (Waters).

La spectrométrie **MALDI-TOF** a été effectuée sur un spectromètre Voyager EliteXL (Applied Biosystems). La matrice utilisée était une solution de HCCA (α -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic acid) à demi-saturation, dans un mélange 50/50 eau/acétonitrile, 0,3 % TFA. Après mélange de 1 μ L de matrice avec 1 μ L d'échantillon, la solution est séchée à l'air. Les ions sont accélérés par un voltage d'extraction de 20 kV. Les spectres de masse ont été obtenus par accumulation de 200 à 1000 tirs de laser.

VI-5- Spectroscopie Raman de résonance

♦ Principe :

Après avoir été soumis à une perturbation, les atomes d'une molécule reviennent à leur état d'équilibre par des mouvements périodiques complexes, décomposés en ondes vibratoires simples appelés mode normaux. Pour chacune de ces oscillations élémentaires, les noyaux se déplacent en phase et à une fréquence donnée qui est caractéristique de la molécule étudiée (géométrie, masse des atomes, intensité des forces de liaison).

La spectroscopie Raman est une spectroscopie vibrationnelle qui concerne les transitions entre différents niveaux vibrationnels de la molécule. L'onde électromagnétique incidente (provenant en général d'un laser envoyant une lumière monochromatique) interagit avec la molécule en déformant son nuage électronique. Il en résulte un moment dipolaire proportionnel au champ électrique et à la polarisabilité de la molécule. Ce moment dipolaire diffuse un rayonnement constitué d'une onde principale de fréquence égale à celle de l'onde incidente (diffusion élastique, diffusion Rayleigh) et d'ondes moins intenses dont les fréquences diffèrent de celle de l'onde incidente (diffusion inélastique, diffusion Raman). Les écarts de fréquence correspondent soit à la capture (raies Stokes), soit à l'émission d'un quantum vibrationnel (raies anti-Stokes) par la molécule. Les écarts de fréquence donnent une indication sur les modes de vibration des molécules et donc sur la nature et la géométrie de ces molécules.

Dans le cas de la spectroscopie Raman de résonance, l'énergie de la radiation incidente est voisine de celle d'une transition électronique de la molécule étudiée. Ceci a l'avantage d'augmenter la probabilité de diffusion Raman et d'exalter de façon importante l'intensité des pics. Cette spectroscopie est ainsi appropriée à l'étude vibrationnelle de solutions diluées (échantillons biologiques).

♦ Informations obtenues :

Pour les protéines contenant un cluster [Fe-S], il est possible de mesurer la fréquence des modes de vibrations associées aux élongations des liaisons Fe-S (situées entre 200 et 450 cm^{-1}) en employant une onde incidente dont la longueur d'onde est dans la bande d'absorption du chromophore. Les fréquences des modes de vibrations observés donnent des informations sur la géométrie globale du centre (nature, symétrie) et sur les ligands.

◆ *Mise en œuvre :*

Les études de spectroscopie Raman ont été réalisées en collaboration avec Luc Bordes du laboratoire des Protéines Transductrices d'Energie au CEA-Saclay. Les spectres de résonance Raman ont été enregistrés sur un spectromètre Jobin Yvon U1000 à double monochromateur additif (Cerzy-Turner). Les expériences ont été conduites à une température de 77 K, avec une onde incidente de longueur d'onde 496 nm provenant d'un laser à argon (modèle Sabre Coherent) à une puissance de 10 mW. Les spectres présentés sont la somme de 8 scans de 400 secondes. La concentration de la protéine dans l'échantillon est d'environ 3 mM.

VI-6- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

◆ *Principe :*

La technique de Résonance Magnétique Nucléaire, qui n'a émergé qu'au cours des vingt dernières années, exploite les propriétés magnétiques des noyaux (spin nucléaire) de certains atomes des molécules étudiées.

Lorsqu'une protéine est placée dans un champ magnétique B_0 , il se produit une levée de la dégénérescence ou séparation des niveaux énergétiques des différents états de spin du noyau considéré (figure 23). Une faible majorité des spins va s'orienter parallèlement au champ magnétique. Les spins vont précesser autour de champ magnétique à une vitesse ω_0 appelée fréquence de Larmor.

L'expérience RMN consiste à exciter les noyaux par des impulsions radiofréquences. Ces impulsions vont rompre l'équilibre et modifier les populations des niveaux d'énergie. Cette excitation permet de modifier l'orientation de l'aimantation macroscopique qui passe d'une orientation parallèle au champ magnétique (à l'équilibre) vers une orientation perpendiculaire au même champ. La précession des spins va générer un courant détectable par une bobine. Ce signal correspond à une sinusoïde amortie dans le temps et est appelée FID (Free Induction Decay). Il est analysé par transformée de Fourier. Cette opération permet de passer du domaine temporel au domaine des fréquences. Chaque fréquence est caractéristique d'un noyau et va permettre son identification (attribution). Après attribution, la corrélation des paires de noyaux va fournir des informations structurales mais aussi dynamiques. Cette technique est aussi très adaptée à d'autres applications telles que des études d'interactions intermoléculaires ou de repliements protéiques.

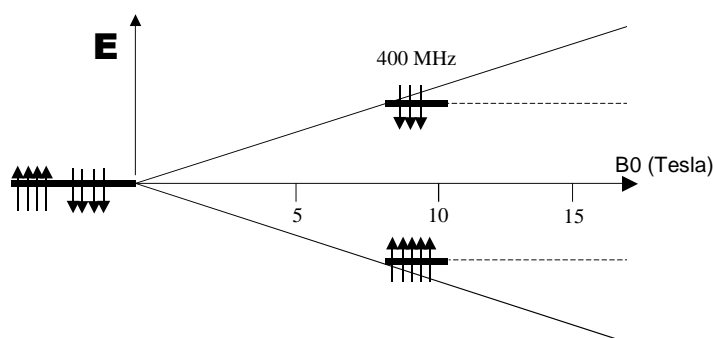


Figure 23 : Principe de la séparation des niveaux d'énergie en RMN

Lorsqu'on place l'échantillon RMN dans le champ magnétique B_0 , on observe une levée de dégénérescence des états de spins. L'écart en énergie est proportionnel à B_0 . La différence de populations (qui obéissent à la loi de Boltzmann) entre les niveaux d'énergies permet le phénomène RMN.

♦ *Mise en œuvre :*

Les études de RMN ont été réalisées par Nicolas Duraffourg en collaboration avec le Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire des Protéines à l'IBS (Institut de Biologie structurale) à Grenoble. Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Varian INOVA à 600 MHz. Les expériences sont conduites à température ambiante, sur des échantillons protéiques de 500 μL à une concentration de l'ordre de 1 mM.

Partie I

Etude des mécanismes de formation du cluster [Fe-S] dans SufA

Lors de mon arrivée au laboratoire, les mécanismes moléculaires de formation des centres [Fe-S] au sein des protéines « scaffold » étaient mal connus. L'étude et la compréhension de ces mécanismes représentaient un enjeu de taille et ont donc constitué l'un des objectifs de ma thèse. Dans ce contexte, et en prenant comme modèle d'étude la protéine SufA, qui dans notre hypothèse est une protéine [Fe-S], nous avons cherché à déterminer le mécanisme de formation du centre [Fe-S] au sein de SufA. Plus précisément, nous avons cherché à savoir quel élément entre le fer et le soufre est incorporé en premier au niveau du site actif de SufA, constitué, je le rappelle, par les résidus cystéines largement conservés.

Notre démarche a consisté à envisager les deux voies de synthèse possibles, à savoir incorporation du soufre puis du fer et inversement, incorporation du fer puis du soufre. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié et caractérisé séparément la fixation du soufre et du fer sur SufA, en s'attachant à déterminer si ces atomes sont liés par les résidus cystéines de la protéine. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'éventuelle formation d'un centre [Fe-S] au sein de SufA à partir de chacune des deux formes intermédiaires possibles (SufA chargée en soufre ou SufA chargée en fer), après ajout de l'élément manquant (fer ou soufre). Toutes ces études, réalisées à l'aide de techniques biochimiques, spectroscopiques et de biologie moléculaire, sont résumées dans la figure I-1.

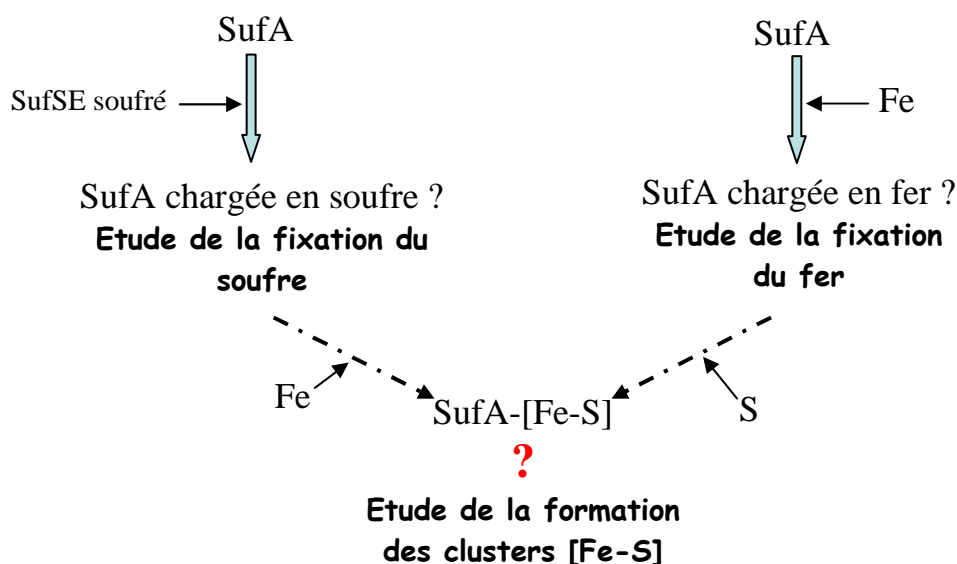


Figure I-1 : démarche adoptée pour l'étude des mécanismes de formation des centres [Fe-S] dans SufA

La présentation des résultats s'organise donc en quatre parties :

- ◆ Obtention des différentes protéines nécessaires à cette étude, SufA, SufE et SufS
- ◆ Etude de la fixation du soufre sur SufA
- ◆ Etude de la fixation du fer sur SufA
- ◆ Etude la formation des centres [Fe-S] à partir de SufA chargée en soufre ou SufA chargée en fer.

Partie I

Chapitre I

Obtention des protéines

Afin d'étudier le mécanisme de formation du cluster [Fe-S] dans SufA, nous avons tout d'abord entrepris la purification des différentes protéines nécessaires à cette étude, à savoir SufA (protéines sauvage et mutantes), SufS et SufE.

I- Obtention des protéines SufA, SufE et SufS

I-1- Obtention des différents plasmides et surexpression

Les gènes *sufA*, *sufE* et *sufS* d'*E. coli* ont été clonés et insérés dans le vecteur pET-22b+. Ceci a été réalisé avant mon arrivée au laboratoire par l'équipe de F. Barras (laboratoire de Chimie Bactérienne à Marseille), qui avait donc fourni les plasmides pET-A_{his}, pET-E_{his} et pET-S_{his} contenant respectivement les gènes *sufA*, *sufE* et *sufS*. Dans chaque cas, la protéine surexprimée possède une extension polyhistidine en C-terminal.

Le plasmide pET-A_{his} a ensuite été utilisé comme plasmide parental lors d'expériences de mutagenèse dirigée sur les cystéines conservées. Ces expériences ont conduit à l'obtention des plasmides pET-SufA_{C50S}, pET-SufA_{C114S}, pET-SufA_{C116S}, pET-SufA_{C116A}, comme décrit dans Matériels et Méthodes. Ces plasmides contiennent respectivement les gènes codant pour les protéines SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} et SufA_{C116A}, pour lesquelles l'une des trois cystéines conservées (Cys50, Cys114 ou Cys116) a été mutée soit en sérine, soit en alanine. Toutes ces protéines contiennent également une étiquette polyhistidine en position C-terminale. Le plasmide pET-SufA_{STOP}, permettant l'expression de la protéine SufA ne comportant pas d'extension polyhistidine, a été obtenu également par mutagenèse dirigée par insertion d'un codon STOP en aval du gène SufA juste avant les six résidus histidines contigus, comme cela est précisé dans la partie Matériels et Méthodes.

Chacun de ces plasmides a alors servi à transformer la souche *E. coli* BL21(DE3) et, dans chaque cas, une colonie isolée, parmi les transformants sélectionnés sur un milieu LB-agar contenant de l'ampicilline, a été utilisée pour inoculer 100 mL de milieu LB/ampicilline. La culture, d'un volume final de 10 L, a été effectuée comme décrit dans Matériels et Méthodes. Brièvement, la surexpression des protéines est induite par l'ajout de 0,5 mM d'IPTG. Après 3 heures d'induction à 37°C, les cellules ont été centrifugées et les culots repris dans le tampon Tris-HCl 100 mM pH=7,5, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM. Les extraits protéiques ont été préparés par sonication. Dans chaque cas, la protéine d'intérêt est retrouvée très majoritairement sous forme soluble.

I-2- Purification des protéines recombinantes

I-2-1- Les protéines SufA_{his}, SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}, SufA_{C116A}.

Ces protéines, possédant une extension polyhistidine, sont purifiées aisément en utilisant une colonne d'affinité, de type NiNTA, suivie d'une colonne d'exclusion stérique, de type Superdex-75.

I-2-1-a- La protéine SufA_{his}

Tout d'abord, on remarque la présence d'une protéine majoritaire dans les extraits cellulaires (figure I-2 gel A) dont la taille, prédite à partir du gel d'électrophorèse SDS, est compatible avec la masse moléculaire de SufA additionnée de la masse de six résidus histidines, soit 14365 Da. Après la première étape chromatographique (colonne d'affinité NiNTA), plusieurs contaminants de hauts poids moléculaires sont présents (figure I-2 gel B). Ceux-ci sont éliminés après séparation sur Superdex-75, comme le montrent le chromatogramme obtenu lors de l'élution de SufA sur Superdex-75 (figure I-3a) ainsi que le gel d'électrophorèse SDS correspondant (figure I-3b). Typiquement, 80 mg de protéine pure (pureté supérieure à 95 %) sont obtenus à partir de 10 L de culture.

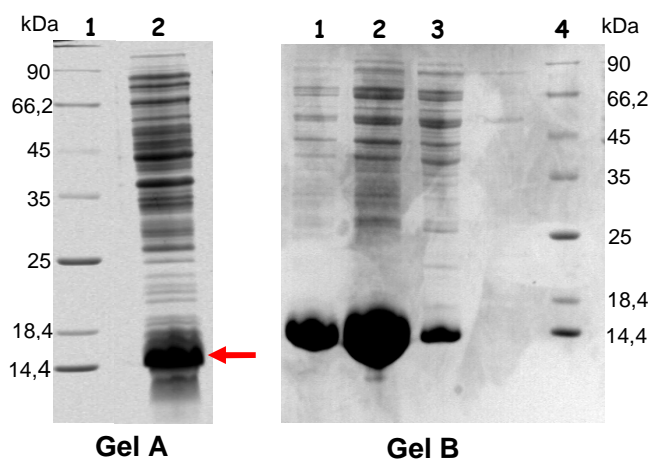


Figure I-2 : gels de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes obtenus durant la purification de SufA sur NiNTA. **Gel A** 1 : marqueurs de masse moléculaire ; 2 : extraits solubles. La protéine SufA, majoritaire, est indiquée par une flèche ; **Gel B** 1, 2, 3 : différentes fractions après chromatographie sur Ni-NTA ; 4 : marqueurs de masse moléculaire

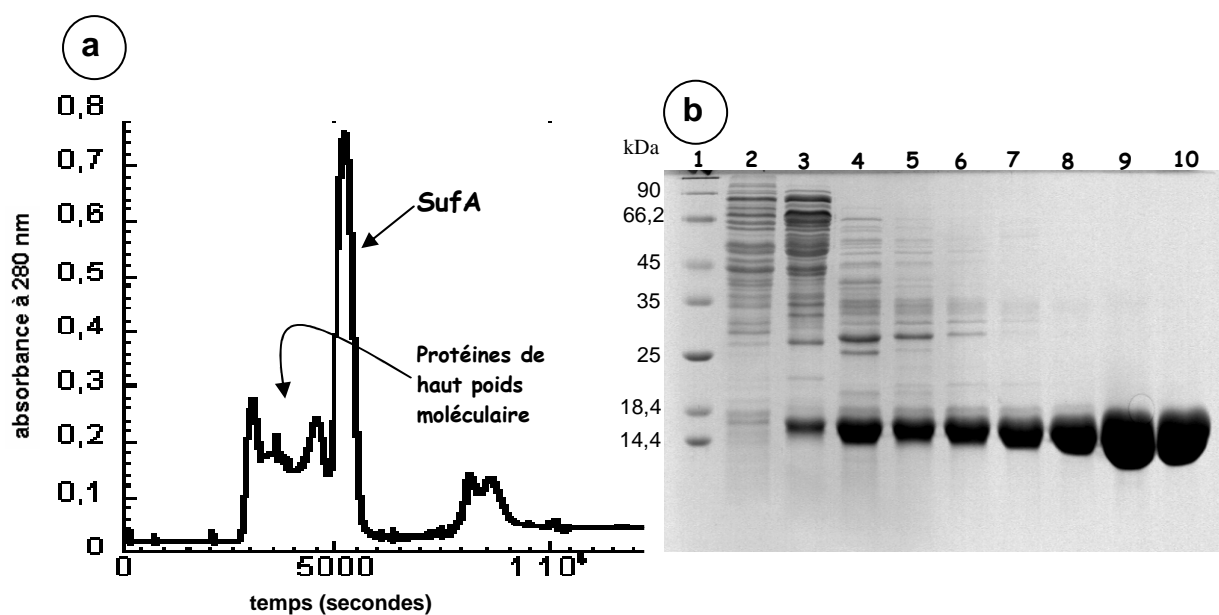


Figure I-3a : profil d'élution obtenu lors de la chromatographie sur Superdex-75 de la fraction protéique récupérée après NiNTA et contenant SufA, réalisée à un débit de 0,5 mL/min dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM.

Figure I-3b : gel de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes présentant les fractions protéiques récupérées lors de l'élution de la Superdex-75 ; 1 : marqueurs de masse moléculaire ; 2 à 6 : fractions éliminées contenant les contaminants de haut poids moléculaire ; 7 à 10 : fractions récupérées contenant la protéine SufA pure

L'état d'oligomérisation de la protéine a été déterminé sur Superdex-75 analytique équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM. Dans ces conditions, la protéine SufA sauvage purifiée est éluée sous forme d'un pic principal (figure I-4). Une calibration de la colonne avec des protéines de masse moléculaire connue a permis de déterminer que ce pic correspondait à la forme dimérique de SufA. Ainsi, la protéine SufA sauvage d'*E. coli* se trouve très majoritairement sous forme de dimère en solution ; une petite quantité de tétramère (10 %) est également présente, comme cela a déjà été observé dans le cas de SufA d'*E. chrysanthemi* (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003).

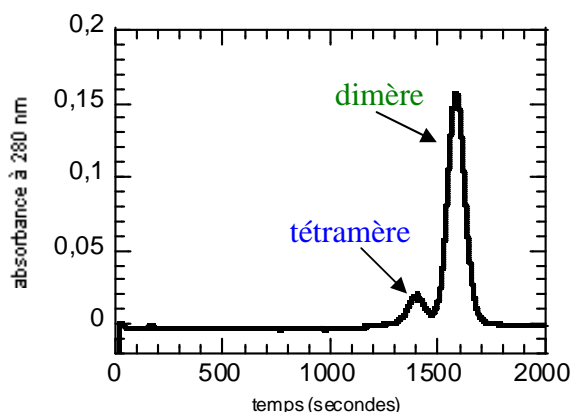


Figure I-4 : profil d'élution obtenu lors de la chromatographie sur Superdex-75 analytique de la protéine SufA sauvage d'*E. coli* (1 mg) réalisée à un débit de 0,5 mL/min dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM.

I-2-1-b- Les protéines mutantes, SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}, SufA_{C116A}

La purification de chacune de ces protéines se déroule de façon similaire à celle de la protéine SufA sauvage : les contaminants présents après chromatographie sur NiNTA sont séparés de la protéine d'intérêt par chromatographie sur Superdex-75. Des gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes montrant l'état de pureté de la protéine SufA_{C116S} au cours de la purification sont montrés en exemple (figure I-5). Des gels similaires sont obtenus pour tous les autres mutants. Dans chaque cas, la protéine est obtenue avec une pureté de plus de 95 %.

Les protéines mutantes sont obtenues avec des rendements similaires à celui de la protéine sauvage. Le tableau I-1 regroupe les résultats obtenus à partir de 10 L de culture, réalisée en milieu riche (LB), pour chacune des protéines.

Protéines			
SufA _{C50S}	SufA _{C114S}	SufA _{C116S}	SufA _{C116A}
80 mg	70 mg	80 mg	120 mg

Tableau I-1 : quantité de protéines pures obtenues à partir de 10 L de culture

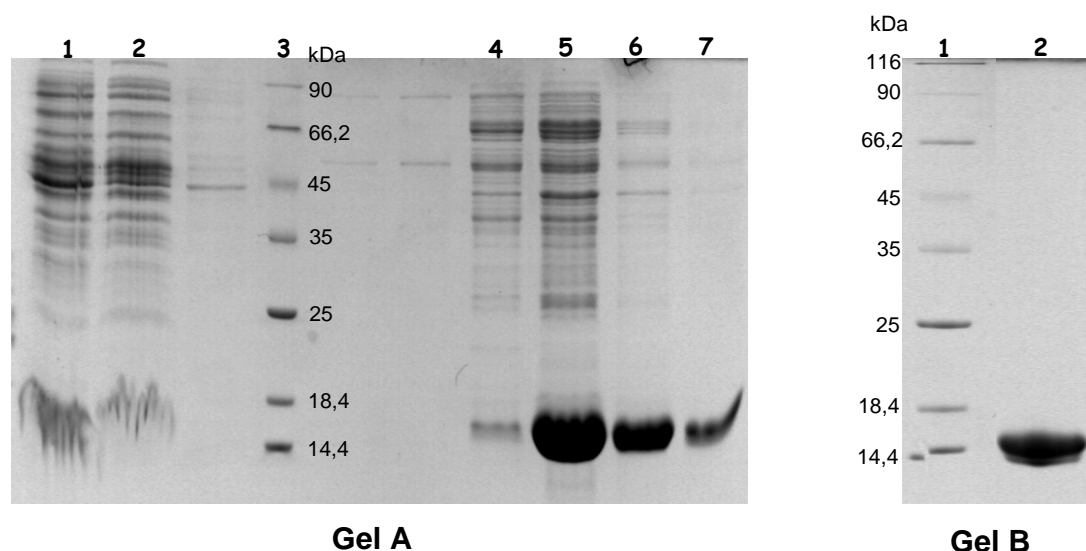


Figure I-5 : gels de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes présentant la protéine SufA_{C116S} après chaque étape de purification. **Gel A** 1 et 2 : extraits solubles ; 3 : marqueurs de masse moléculaire ; 4 à 7 : fractions récupérées après chromatographie sur NiNTA et contenant SufA_{C116S} ; **Gel B** 1 : marqueurs de masse moléculaire ; 2 : fraction après chromatographie sur Superdex-75

L'étape de chromatographie par filtration sur gel (colonne Superdex-75 analytique, tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM) a révélé que le mutant SufA_{C50S} se comporte comme la protéine sauvage et se trouve donc en solution sous forme de dimère majoritairement (88 %) et de tétramère (12 %). En revanche, les mutants SufA_{C114S} et SufA_{C116S} sont présents exclusivement sous forme dimérique en solution (figure I-6).

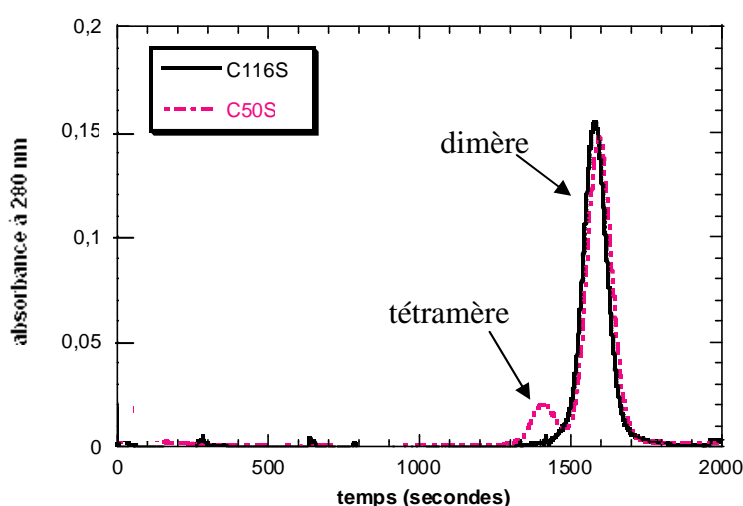


Figure I-6 : profils d'élution obtenus lors de chromatographies sur Superdex-75 analytique des protéines SufA_{C50S} et SufA_{C116S} (1 mg) réalisées à un débit de 0,5 mL/min dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM. Le profil d'élution de la protéine SufA_{C114S} est superposable à celui de la protéine SufA_{C116S}.

I-2-2- La protéine SufA_{STOP}

La protéine SufA_{STOP} ne possède pas d'étiquette polyhistidine. La méthode précédemment utilisée, comportant une colonne d'affinité, n'a donc pas pu être appliquée dans ce cas. Néanmoins, le protocole de purification mis au point pour la purification de la protéine SufA_{STOP} reste simple. Il comporte deux étapes, une précipitation au sulfate d'ammonium (40 %) suivie d'une colonne d'exclusion stérique (Superdex-75), qui ont été réalisées comme décrit dans Matériels et Méthodes. L'état de pureté de la protéine à chaque étape de purification est représenté figure I-7. On remarque que les fractions 7 à 13 sont pures ; la légère bande visible à 28 kDa correspond au dimère de SufA.

La protéine SufA_{STOP} est obtenue pure (pureté \approx 95 %) avec un très bon rendement : environ 180 mg de protéine pure sont recueillis à partir de 10 L de culture.

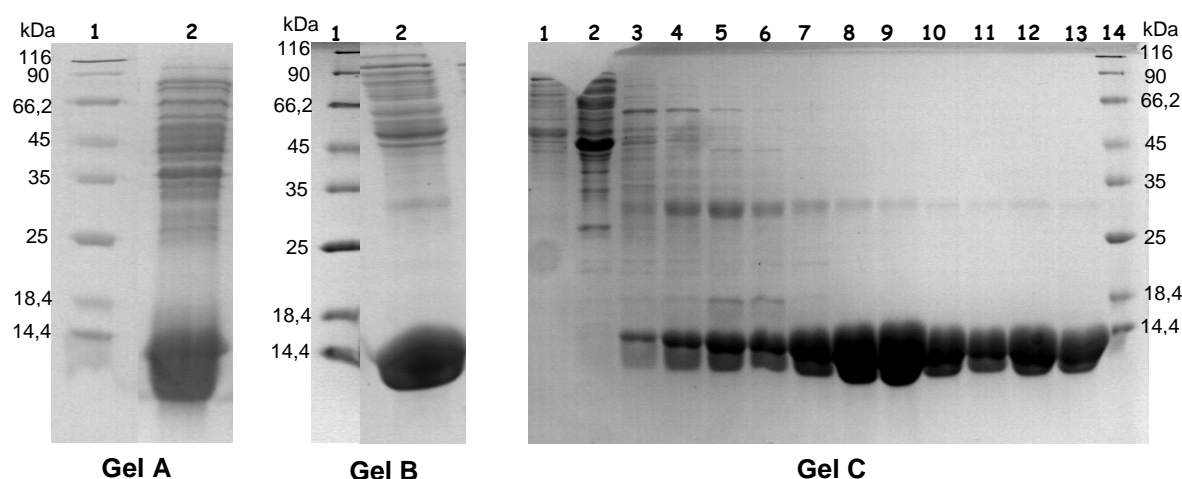


Figure I-7 : gels de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes présentant la fraction protéique après chaque étape de purification. **Gel A** 1 : marqueur de masse moléculaire ; 2 : extraits solubles. **Gel B** 1 : marqueurs de masse moléculaire ; 2 : fraction après précipitation au sulfate d'ammonium 40 %. **Gel C** 1 à 6 : fractions éliminées par Superdex-75 et contenant les contaminants ; 7 à 13 : fraction contenant la protéine SufA_{STOP} pure ; 14 : marqueurs de masse moléculaire

I-2-3- Les protéines SufS et SufE

Ces deux protéines, possédant une extension polyhistidine en C-terminal, ont été purifiées selon le même mode opératoire que la protéine SufA_{his}. Les contaminants présents après la première étape de purification sur NiNTA sont également éliminés par chromatographie sur Superdex-75. On peut noter que dans le cas de SufS, la protéine est éluée sous forme de deux pics lors de la deuxième étape chromatographique (voir figure I-8a).

Seules les fractions du deuxième pic sont jaunes ; elles correspondent à SufS pure contenant son cofacteur, le Pyridoxal Phosphate (PLP), c'est-à-dire à la forme active de la protéine.

Pour chacune des protéines SufE et SufS, environ 60 mg de protéine pure sont obtenus à partir de 10 L de culture. La figure I-8b représente des gels d'électrophorèse SDS montrant l'état de pureté des protéines SufS et SufE au cours des différentes étapes de purification.

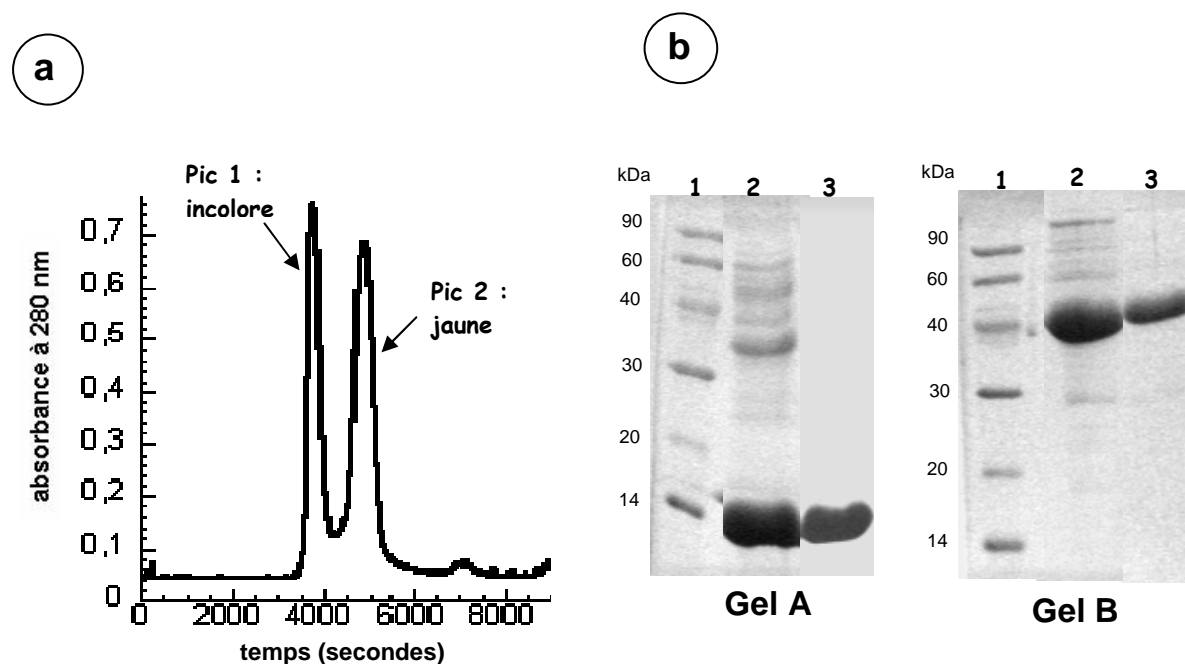


Figure I-8a : profil d'élution obtenu lors de la chromatographie sur Superdex-75 de la fraction protéique récupérée après NiNTA et contenant SufS, réalisée à un débit de 0,5 mL/min dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM.

Figure I-8b : gels de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes présentant la fraction protéique après chaque étape de purification. 1 : marqueurs de masse moléculaire ; 2 : fraction après chromatographie sur NiNTA ; 3 : fraction après chromatographie sur Superdex-75. **Gel A** : cas de SufE. **Gel B** : cas de SufS.

II- Caractérisation biochimique des protéines SufA, SufE et SufS

II-1- Les protéines SufA (sauvages et mutantes)

Nous avons remarqué que la protéine SufA_{his} a une coloration rougeâtre qui disparaît au cours de la purification. En effet, les extraits protéiques solubles sont très légèrement rosés et on observe la formation d'un anneau rougeâtre lors du dépôt de ces extraits sur la colonne d'affinité NiNTA. Après élution, SufA est récupérée avec une légère teinte rosée, ce qui peut

être le signe de la présence de centres [Fe-S] ou simplement de fer au sein de la protéine. Cependant, après la deuxième étape chromatographique (Superdex-75), cette coloration n'est plus détectée ; ceci suggère soit que les éventuels centres métalliques dans SufA sont instables, soit que la coloration rosée était due aux contaminants présents avant la purification sur Superdex-75. En fait, une légère teinte rosée reste visible à très forte concentration (de l'ordre de 60 mg/mL), ce qui suggère que la protéine SufA conserve, après purification, un centre métallique, mais à l'état de traces (voir paragraphes suivants). Cette caractéristique est observée également dans le cas de la protéine SufA_{STOP}. Dans le cas des protéines mutantes et plus particulièrement dans le cas des protéines SufA_{C114S}, SufA_{C116S} et SufA_{C116A}, nous avons pu remarquer que la teinte rougeâtre des extraits protéiques déposés sur le gel de NiNTA est moins marquée.

II-1-1- Spectroscopie d'absorption UV-visible

Nous avons observé que toutes les protéines SufA purifiées (sauvages ou mutées) possèdent un spectre UV-visible tout à fait identique, à faible concentration. Le spectre d'absorption UV-visible enregistré pour la protéine SufA_{his} est présenté, en exemple, en figure I-9. Sur ce spectre, on observe un seul pic à 280 nm qui correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. L'absence d'autres bandes d'absorption, notamment entre 300 nm et 500 nm, montre que la protéine SufA (sauvage ou mutante et possédant ou non une étiquette polyhistidine) est obtenue principalement sous forme apo après purification, c'est-à-dire sans cofacteur métallique.

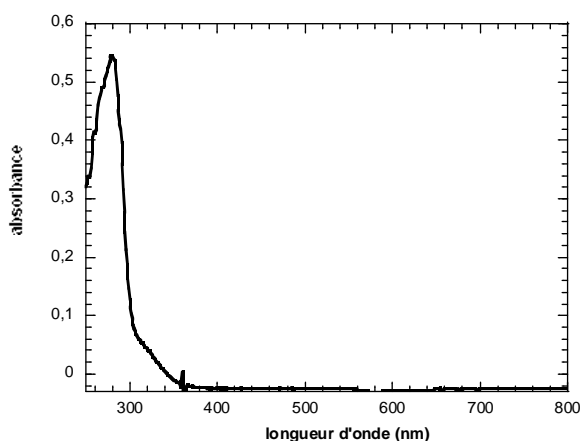


Figure I-9 : Spectre d'absorption UV-visible de la protéine SufA sauvage (35 μ M) enregistré avec une cuve de 1 cm de trajet optique, dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM.

Cependant, à très forte concentration, le spectre UV-visible de la protéine SufA sauvage (figure I-10) comporte des bandes d'absorption à 420 nm et 460 nm. Elles se trouvent dans la région des bandes de transfert de charge $S \rightarrow Fe(III)$, qui sont caractéristiques de la présence d'un centre $[Fe-S]$. Dans le cas des mutants, le spectre UV-visible ne comporte pas de bande d'absorption bien définie, suggérant un rôle des résidus cystéines dans le maintien du centre métallique de la protéine.

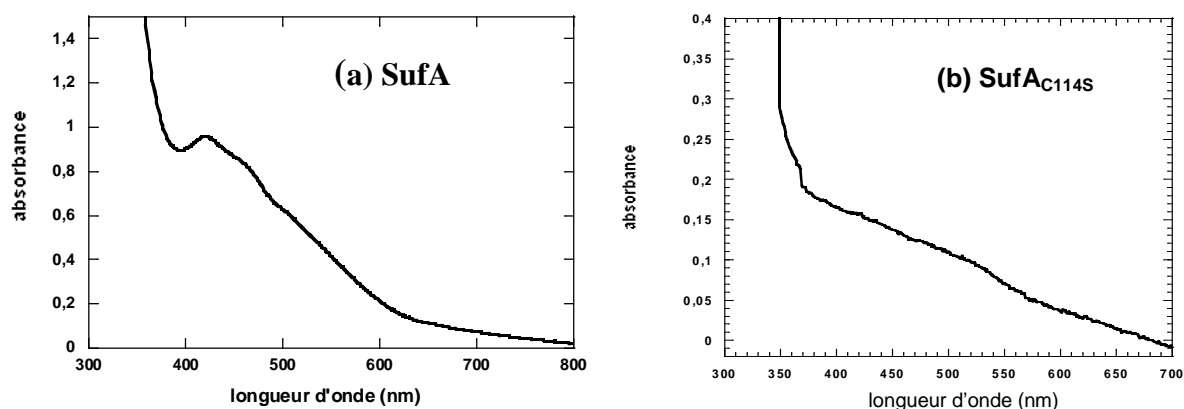


Figure I-10 : spectres d'absorption UV-visible (a) de la protéine SufA sauvage (5,6 mM), (b) de la protéine SufA_{C114S} (2,8 mM), enregistrés avec une cuve de 1 cm de trajet optique, dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM. Les spectres des protéines SufA_{C116S} et SufA_{C50S} sont identiques à celui présenté pour la protéine SufA_{C114S}.

II-1-2- Quantification du fer et du soufre

Le contenu en fer et en soufre dans les différentes protéines SufA (sauvages et mutantes) après purification a été déterminé sur plusieurs préparations comme décrit dans Matériels et Méthodes. Dans chacun des cas, nous avons trouvé une très faible quantité de fer et de soufre (entre 0,05 et 0,1 atome de fer et de soufre par monomère pour la protéine sauvage ; les valeurs déterminées dans le cas des protéines mutantes sont inférieures à 0,05). Ce qu'il est important de noter, c'est que des quantités stoechiométriques de fer et de soufre ont été trouvées dans le cas de la protéine sauvage. Ceci suggère que les atomes de fer et de soufre sont présents sous forme de cluster $[Fe-S]$, mais en très faible quantité, et qu'ils sont probablement progressivement éliminés au cours de la purification.

II-2- Les protéines SufE et SufS

La protéine SufE pure est incolore, alors que la protéine SufS possède une coloration jaune bien marquée, due à la présence de son cofacteur, le PLP.

Des spectres UV-visible ont été enregistrés pour chacune de ces deux protéines (figure I-11). Dans le cas de SufS, on note la présence d'une bande d'absorption caractéristique à 420 nm correspondant à la présence du PLP. D'après le coefficient d'extinction molaire du PLP ($\epsilon=6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) on a pu déduire, par la loi de Beer-Lambert, qu'il y a environ 1 cofacteur PLP par monomère de SufS, ce qui est en accord avec les données présentes dans la littérature dans le cas de NifS (Zheng *et al.*, 1993). Le spectre de SufE, quant à lui, ne montre pas d'absorption caractéristique même à forte concentration : ceci confirme que SufE ne possède pas de cofacteur.

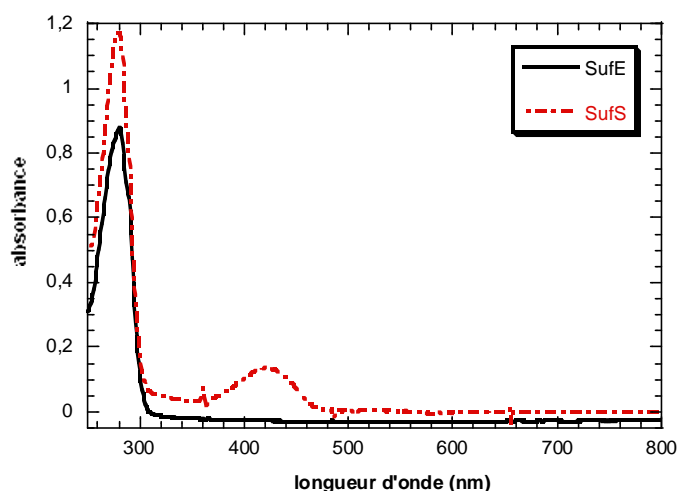


Figure I-11 : Spectres d'absorption UV-visible des protéines SufE (40 μM) et SufS (24 μM) enregistrés avec une cuve de 1 cm de trajet optique.

Conclusion : Les trois protéines SufA, SufE et SufS ont été obtenues avec de bons rendements et une bonne pureté. Le point important à retenir est que la protéine SufA conserve après purification des traces d'un centre métallique, celui-ci étant très probablement un centre [Fe-S], comme le suggèrent les dosages de fer et de soufre (quantités stoechiométriques de fer et de soufre) et les analyses de spectroscopie UV-visible. Ce résultat, ajouté à celui précédemment obtenu au laboratoire montrant que SufA pouvait être reconstituée chimiquement (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004), nous conforte dans l'idée

que SufA d'*E. coli* est une protéine [Fe-S]. Par la suite, je m'intéresserai à l'étude, dans des conditions *in vitro*, des mécanismes moléculaires d'assemblage de ce centre [Fe-S], selon la démarche décrite en introduction (voir figure I-1).

Partie I

Chapitre II

Etude de la fixation du soufre sur SufA

Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, il est admis que dans l'opéron *suf*, le soufre est mobilisé par le complexe SufSE à partir de L-cystéine libre. La réaction se passe en premier lieu au niveau du site actif de SufS où un persulfure est généré sur le résidu Cys364. L'atome de soufre est ensuite transféré, selon une réaction de transpersulfuration, au niveau d'une cystéine conservée de SufE (Cys51), qui peut accepter jusqu'à 5 atomes de soufre sous forme de persulfures et polysulfures (Cys51-(S)_n-SH) (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003). SufSE a donc été caractérisé comme étant le donneur de soufre de l'opéron *suf* via SufE. Ceci ayant été établi, le but de l'étude menée ici est de mettre en évidence et de caractériser un potentiel transfert de soufre de SufE à SufA. Pour cela, nous avons utilisé la technique de spectrométrie de masse.

I- Le transfert de soufre de SufSE à SufA

Pour chaque série d'expériences, les protéines étudiées SufA, SufE et SufS ont été préalablement traitées au DTT, puis déssalées sur colonne Micro Bio-spin, afin de réduire les éventuels ponts disulfures pouvant exister entre les résidus cystéines des protéines. L'ensemble des expériences est réalisé en boîte à gants (O₂ < 4 ppm), à 18°C, afin de s'affranchir de tout problème d'oxydation.

I-1- Analyses préliminaires de spectrométrie de masse

Pour référence, les différentes protéines étudiées (SufA sauvages et mutantes, SufS et SufE) ont été analysées, après purification, par spectrométrie de masse. Cela a permis de déterminer que la masse exacte de

♦ SufA_{his} est : $M_{\text{SufA}} = 14365 \text{ Da}$, en accord avec la masse théorique basée sur l'étude de la séquence en acides aminés (14365 Da).

♦ SufA_{STOP} est : $M_{\text{SufA}} = 13298 \text{ Da}$, en accord avec la masse théorique basée sur l'étude de la séquence en acides aminés (13300 Da).

♦ SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}, est : $M_{\text{SufA}} = 14347 \text{ Da}$, en accord avec la masse théorique basée sur l'étude de la séquence en acides aminés (13349 Da).

♦ SufE est : $M_{\text{SufE}} = 16734 \text{ Da}$, en accord avec la masse théorique basée sur l'étude de la séquence en acides aminés (16865 Da moins 131 Da correspondant au clivage de la méthionine N-terminale).

♦ SufS est : $M_{\text{SufS}} = 45500 \text{ Da}$, en accord avec la masse théorique basée sur l'étude de la séquence en acides aminés (45499 Da).

I-2- Caractérisation du donneur de soufre, le complexe SufSE

I-2-1- Etude par spectrométrie de masse

Afin de vérifier, dans le cas de nos préparations protéiques, la présence de soufre sur SufE, comme cela a été démontré lors de récentes études (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003), nous avons préparé la forme soufrée du complexe SufSE, comme décrit précédemment (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003) : SufS (100 μM) et SufE (100 μM) sont mélangées en quantités stœchiométriques (1:1) en présence de L-cystéine (4 mM). Après 30 minutes d'incubation, la solution est purifiée sur colonne Micro Bio-spin équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM pH=7,5, pour éliminer la cystéine en excès et l'alanine formée pendant la réaction. L'échantillon est ensuite analysé par spectrométrie de masse.

Les spectres (figure I-12 A) montrent clairement la présence de plusieurs atomes de soufre (jusqu'à 5 atomes de soufre) fixés à la protéine SufE, confirmant les données de la littérature. En effet, en plus du pic correspondant à la forme apo de SufE ($M_{\text{SufE}} = 16734 \text{ Da}$), on observe cinq pics additionnels indiquant une masse $M = M_{\text{SufE}} + nx32 \text{ Da}$, $n = 1, 2, 3, 4$ ou 5 , 32 Da étant la masse d'un atome de soufre. Les analyses révèlent également qu'il reste du soufre sur la protéine SufS (formes avec 1 et 2 atomes de soufre) (figure I-13). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'après avoir transféré du soufre à SufE, le site actif de SufS est libre et peut de nouveau fixer du soufre, sous forme de persulfures/polysulfures, à partir de L-cystéine présente en excès dans le milieu réactionnel. Ces résultats sont observés quelque soit le temps d'incubation (30 minutes ou 2 heures) et la température d'incubation (18°C ou 37°C).

D'autre part, l'ajout de DTT (5 mM) sur cette préparation conduit à l'obtention des formes apo de SufS et SufE (figure I-12 B) montrant que les atomes de soufre sont présents au sein de ces protéines sous forme de persulfures/polysulfures.

La forme soufrée de SufSE sera nommée par la suite **SufSE-SSH**.

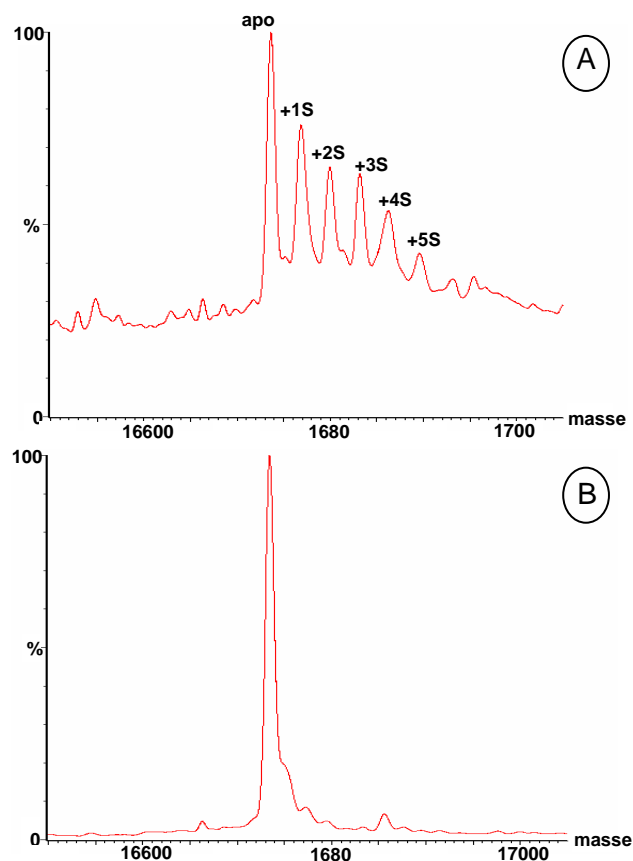


Figure I-12 : spectre reconstruit de la protéine SufE (500 nM) après incubation avec des quantités stoechiométriques de SufS et un excès de cystéine (A) puis après traitement avec un excès de DTT (B).

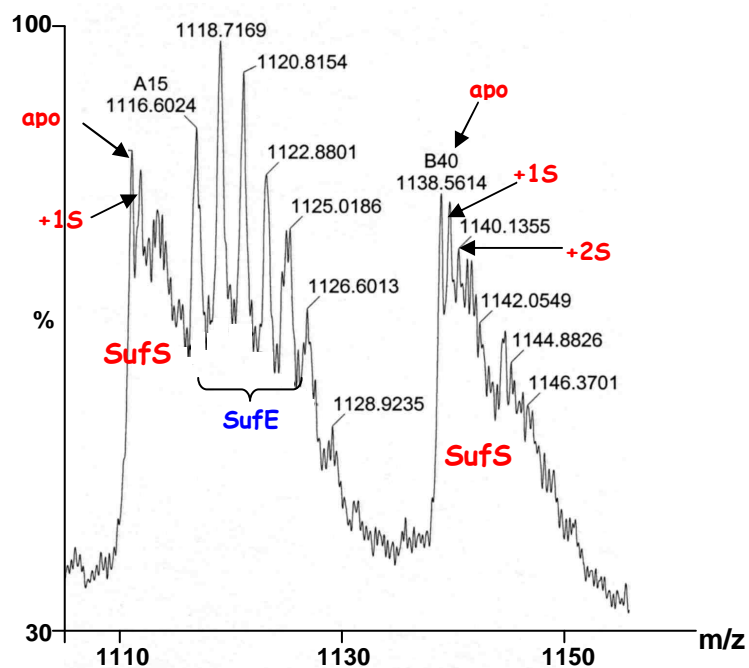


Figure I-13 : spectre de masse des protéines SufE et SufS (500 nM) ; gamme du spectre m/z=1105-1165. SufS 100 μ M, SufE 100 μ M ont été incubées en présence de L-cystéine (4 mM) pendant 30 minutes à 18°C en conditions anaérobies puis dessalées.

I-2-2- Dosage de soufre dans SufSE-SSH

La quantité de soufre présente au sein du complexe SufSE, après incubation avec la L-cystéine et dessalage, a été déterminée pour plusieurs préparations protéiques, selon la méthode de Beinert, comme décrit dans Matériels et Méthodes. Les dosages révèlent qu'il y a 4 atomes de soufre par complexe SufSE.

Il aurait été intéressant de pouvoir séparer les protéines SufS et SufE afin de déterminer le contenu moyen en soufre de chacune d'elles au sein du complexe. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre au point un protocole permettant de réaliser cette séparation pour les raisons suivantes : (1) SufS et SufE interagissent fortement entre elles. De fait, elles sont co-éluées sur colonne d'affinité (Loiseau *et al.*, 2003); (2) les persulfures/polysulfures présents sur ces protéines ne sont pas stables sur colonnes chromatographiques (de type Superdex-75 ou colonne hydrophobe). En effet, après ces étapes chromatographiques, aucun atome de soufre n'est détecté au sein des protéines par spectrométrie de masse.

I-3- Etude de la fixation de soufre sur SufA

Deux protocoles ont été mis au point afin de charger la protéine SufA en soufre : ils requièrent l'utilisation soit de quantités « stoechiométriques », soit de quantités catalytiques de SufS/SufE par rapport à SufA.

I-3-1- Conditions « stoechiométriques »

Après optimisation des conditions expérimentales, une expérience a été réalisée comme suit : SufA_{his} (200 μ M) a été ajoutée à la forme soufrée du complexe SufSE, SufSE-SSH (100 μ M). Après 30 minutes d'incubation à 18°C, le mélange est analysé par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF. Malgré la complexité des spectres (présence des protéines SufA, SufE et SufS), on remarque que pour chaque état de charge de SufA, plusieurs pics apparaissent : celui correspondant à la forme apo ($M=14365$ Da), et 3 pics supplémentaires indiquant une masse $M = M_{\text{SufA}} + nx32$ Da, $n = 1, 2$ ou 3 , montrant que SufA est capable de fixer plusieurs atomes de soufre (figure I-14).

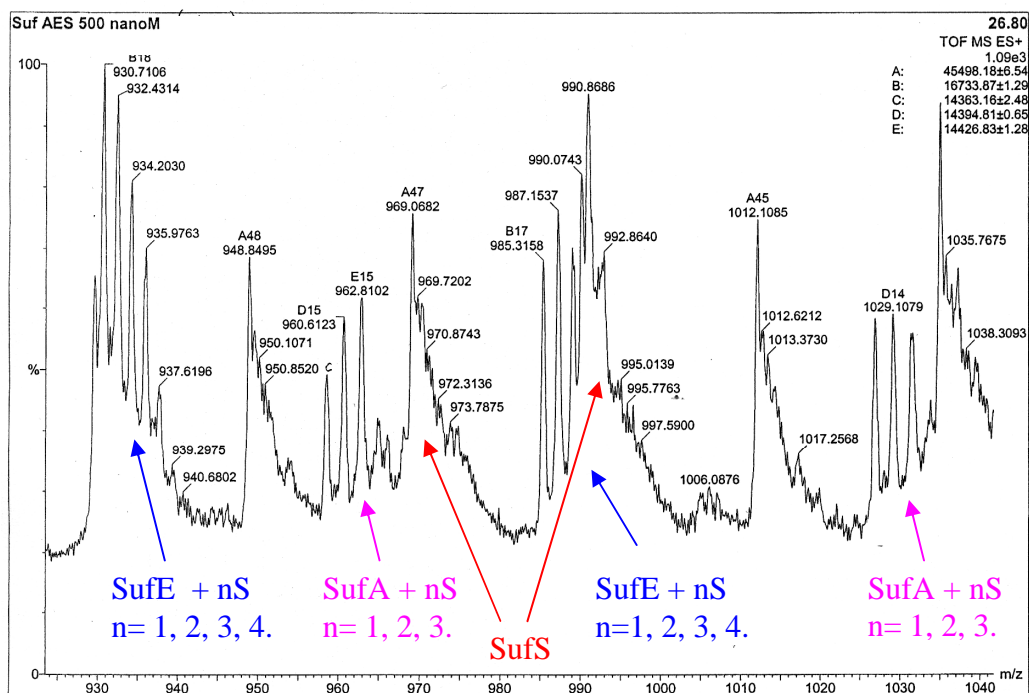


Figure I-14 : spectre de masse du mélange SufA/SufE/SufS (2 : 1 : 1) obtenu après 30 minutes d'incubation de SufA avec SufSE-SSH, dans la gamme $m/z = 920-1040$. On remarque que SufA peut fixer jusqu'à 3 atomes de soufre et qu'il reste du soufre sur SufSE.

En raison de la présence, dans le mélange, de plusieurs protéines, dont les états de charge peuvent se superposer, il est difficile de fournir un spectre reconstruit de SufA. Cependant, sachant que pour tous les spectres de masse (ceux de SufA apo et SufA soufrée), la distribution des états de charge et leur intensité relative sont similaires, il est possible de comparer les aires des pics correspondant à la forme apo avec ceux correspondant aux formes soufrées de SufA, afin de fournir une bonne approximation de l'abondance relative de ces différentes formes. Par conséquent, après avoir vérifié que la largeur à mi-hauteur de tous les pics était identique, nous avons calculé une moyenne de l'intensité de chaque pic (celui correspondant à la forme apo et ceux correspondant aux 3 formes soufrées de SufA) à partir de 3 états de charge consécutifs. Puis, en considérant que la somme de l'intensité des pics est égale à 100, nous avons pu représenter les résultats obtenus sous forme d'un histogramme indiquant les proportions relatives de chacune des formes de SufA (figure I-15). La figure I-15 « Stoechio » confirme que, dans les conditions expérimentales utilisées ici, SufA est capable de fixer jusqu'à 3 atomes de soufre. L'échantillon contient en fait un mélange de formes apo (18%), de formes ayant fixé 1 atome de soufre (32%), 2 atomes de soufre (42%) et 3 atomes de soufre (8%). Une analyse quantitative à partir de l'abondance relative des

différentes formes de SufA permet d'estimer la fixation de soufre sur la protéine à 1,4 atomes par monomère.

L'addition d'un réducteur (DTT ou le système NADPH-thioredoxine réductase-thioredoxine) dans le mélange réactionnel conduit à l'obtention de la forme apo initiale de SufA uniquement (figure I-15 « DTT »). Ceci révèle que les atomes de soufre sont présents sur SufA sous forme de persulfures/polysulfures.

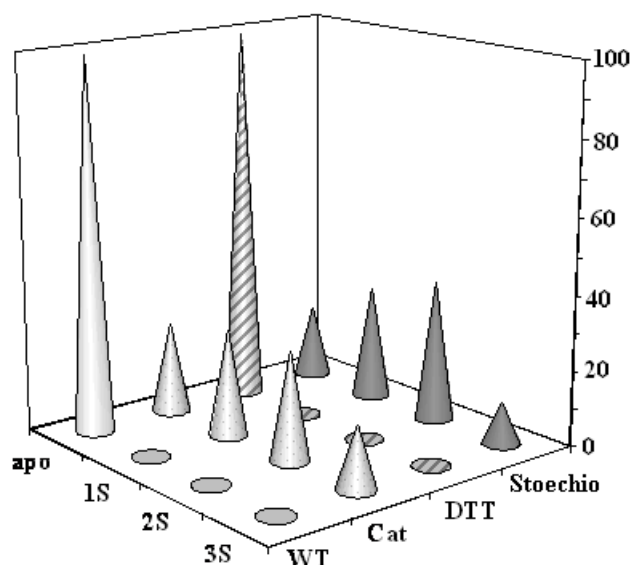


Figure I-15 : représentation des quantités relatives des différentes formes de SufA présentes pour chaque type d'expérience. « WT » désigne la protéine SufA_{his} apo, servant de référence.

Le fait que SufA fixe du soufre après incubation avec une solution contenant uniquement la forme soufrée du complexe SufSE mais pas de cystéine libre, montre clairement que le soufre présent sur SufA provient de SufE, probablement via une réaction de transpersulfuration, et donc que le transfert de soufre de SufE à SufA est direct. On peut ainsi raisonnablement établir le schéma suivant :

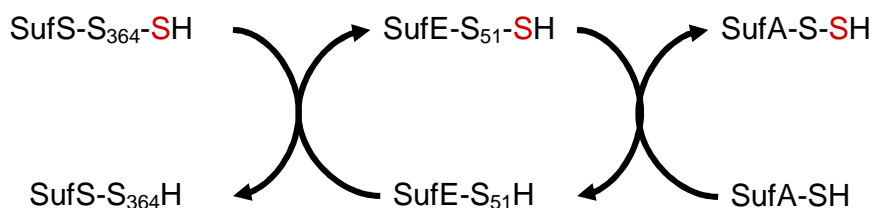


Figure I-16 : Transfert de soufre entre SufS, SufE et SufA par réactions de transpersulfuration

Il est intéressant de noter que la protéine SufA_{STOP} se comporte comme la protéine SufA_{his}. L'étiquette polyhistidine n'interfère pas dans le transfert de soufre.

Par la suite, la forme soufrée de SufA sera notée **SufA-SSH**.

Une cinétique de transfert de soufre de SufSE-SSH à SufA a été réalisée. On remarque que quels que soient les temps d'incubation (10 minutes, 30 minutes, 1 heure ou 3 heures), les spectres de masse du mélange SufA/SufE/SufS sont rigoureusement identiques. Le transfert de soufre est donc un processus assez rapide (pas plus de 10 minutes à 18°C). De plus, nous avons vérifié que la température d'incubation n'avait pas d'effet sur le transfert : le spectre de masse obtenu après une heure d'incubation, à 37°C, est encore une fois le même. Nous n'avons pas observé de pic de masse correspondant à l'addition de 4 atomes de soufre sur SufA. Ces résultats nous permettent de conclure que, dans les conditions expérimentales utilisées ici (quantités « stoechiométriques » de SufSE par rapport à SufA) SufA peut fixer jusqu'à 3 atomes de soufre et que la réaction de transfert de soufre de SufSE à SufA atteint un équilibre : elle n'évolue plus.

I-3-2- Conditions catalytiques

SufA (200 µM) a été incubée avec des quantités catalytiques de SufS (6 µM), SufE (6 µM) et un excès de L-cystéine (10 mM) pendant 3 heures à 37°C. Après purification de l'échantillon sur colonne Micro Bio-spin afin d'éliminer l'excès de cystéine et l'alanine formée, celui-ci est analysé par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF. Les spectres sont plus lisibles que précédemment. Les pics correspondant à la protéine SufA, présente en large excès, ressortent davantage par rapport à ceux des protéines SufS et SufE, présentes en faibles quantités. Trois pics apparaissent nettement, correspondant à l'addition de 1, 2 ou 3 atomes de soufre sur SufA. Les spectres ont alors été traités comme précédemment, afin de représenter les quantités relatives des différentes formes de SufA. Comme le montre la figure I-15 « cat », les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus sur un seul cycle catalytique : les proportions relatives des formes soufrées de SufA sont similaires et on note au maximum 3 atomes de soufre sur SufA.

I-3-3- Influence de l'oxygène sur le transfert de soufre

Dans le but d'étudier l'influence des conditions d'aération du milieu, les expériences de transfert de soufre de SufSE à SufA ont été répétées, en conditions stoechiométriques, (1) avec une protéine SufA non prétraitée au DTT, en conditions anaérobies, (2) avec une protéine SufA prétraitée ou non au DTT, en conditions aérobies. Dans chaque cas, nous avons pu observer la fixation de plusieurs atomes de soufre (jusqu'à 3) sur SufA. Les spectres de masse obtenus sont identiques à ceux présentés précédemment (figure I-14) dans le cas où les expériences étaient réalisées en conditions anaérobies, avec une protéine SufA prétraitée au DTT. Ceci semble indiquer que le processus de transfert de soufre, dans nos conditions, n'est pas sensible à l'oxygène et que les cystéines de la protéine SufA ne forment pas de ponts disulfures entre elles ; elles sont accessibles et réactives pour fixer du soufre.

I-3-4- Etude de la spécificité du transfert de soufre

Le transfert de soufre de SufSE à SufA ayant été établi, nous avons étudié sa spécificité, tant au niveau du donneur que de l'accepteur de soufre.

I-3-4-a- Comparaison de différents donneurs de soufre

Tout d'abord, SufA, prétraitée ou non au DTT, a été incubée pendant 30 minutes, en conditions anaérobies, avec du soufre introduit sous forme chimique (sulfure de sodium Na_2S). Les analyses ont alors fourni un spectre de masse superposable au spectre de référence de SufA (SufA apo), montrant donc que SufA n'est pas capable de fixer du soufre lorsque celui-ci est apporté sous forme libre S^{2-} . On peut faire remarquer que ce résultat était attendu dans le cas où SufA était prétraitée au DTT ; en effet, dans ces conditions, les cystéines de la protéine sont réduites et présentent donc un caractère nucléophile fort. Elles ne peuvent alors pas réagir avec les ions sulfures, ayant également un caractère nucléophile.

Ensuite, différents donneurs physiologiques de soufre ont été testés. Comme cela a été mentionné en introduction, le soufre est fourni dans la cellule par des enzymes ayant une activité cystéine désulfurase. Il en existe trois chez *E. coli* : IscS, SufS/SufE et CsdA/CsdE (Flint, 1996; Loiseau *et al.*, 2003; Loiseau *et al.*, 2005). Nous avons donc étudié la capacité de SufA à accepter du soufre de ces différents systèmes, qui sont disponibles au laboratoire. Nous avons en fait testé IscS, CsdA et SufS qui possèdent à elles seules les activités cystéine

désulfurase spécifiques suivantes : CsdA : 0,95 $\mu\text{mol/min/mg}$; IscS : 0,55 $\mu\text{mol/min/mg}$; SufS : 0,14 $\mu\text{mol/min/mg}$. Dans chaque cas, SufA (200 μM) a été incubée avec des quantités catalytiques (6 μM) de cystéine désulfurase, en présence d'un excès de L-cystéine libre (10 mM), pendant 3 heures à 37°C, puis purifiée sur colonne afin d'éliminer l'excès de cystéine et l'alanine formée. Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus à ceux observés précédemment, dans le cas où le donneur de soufre était le complexe SufSE. Les spectres de masse de SufA après incubation avec IscS ou CsdA sont superposables à ceux obtenus lorsque SufSE est le donneur de soufre. Ainsi, SufA est capable de fixer jusqu'à 3 atomes de soufre, et dans des proportions comparables, après transfert depuis IscS, CsdA ou SufSE. En revanche, seule la forme apo de SufA est présente lorsque la protéine est incubée avec SufS seule. Ceci s'explique par la faible activité cystéine désulfurase de SufS. Ces résultats indiquent qu'il n'existe pas de spécificité au niveau du donneur de soufre. Le transfert de soufre à SufA nécessite simplement une enzyme ayant une activité cystéine désulfurase significative.

I-3-4-b- Comparaison de différents accepteurs de soufre

Afin de déterminer si le complexe SufSE mobilise du soufre pour le transférer spécifiquement à SufA, plusieurs protéines (IscA, la ferrédoxine de l'opéron *isc*, SufB, SufD, SufC, la biotine synthase (BioB), la protéine H d'*E. coli*, ainsi que la rubrédoxine de *C. pasteurianum*) ont été testées en tant que potentiels accepteurs de soufre. Comme nous l'avons déjà évoqué en introduction, IscA est homologue à SufA ; elle possède trois résidus cystéines conservés localisés en surface et supposés lier des centres [Fe-S] transitoires (Wollenberg *et al.*, 2003). La ferrédoxine de l'opéron *isc* est une protéine [2Fe-2S] possédant quatre résidus cystéines identifiés comme étant les ligands du centre (Ta and Vickery, 1992). SufB a été caractérisée au laboratoire comme pouvant assembler un centre de type [4Fe-4S] au niveau de résidus cystéines (Layer *et al.*, 2007). La biotine synthase peut également coordonner un centre [Fe-S] par des résidus cystéines (Ugulava *et al.*, 2000). La rubrédoxine est une protéine contenant comme cofacteur métallique un centre à fer mononucléaire coordonné par quatre cystéines (Mathieu *et al.*, 1992). SufC, SufD sont des protéines jouant un rôle dans la biosynthèse des centres [Fe-S] et possédant respectivement 1 et 3 résidus cystéines qui n'interviennent pas dans la coordination de centres métalliques (Nachin *et al.*, 2003). Enfin, la protéine H, sous-unité du complexe glycine décarboxylase impliqué dans le processus de la respiration, possède également 2 résidus cystéines (Gueguen *et al.*, 1999).

Toutes les expériences ont été réalisées en conditions catalytiques, puis analysées par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF. Dans le cas de la rubrédoxine, la présence de soufre au sein de la protéine a été déterminée par dosage colorimétrique, puisqu'il semble que la protéine s'ionise mal ; de fait, elle n'est pas visible en spectrométrie de masse. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

Accepteur	Transfert de soufre depuis SufSE
IscA	+ Jusqu'à 3 atomes de soufre fixés à IscA
Ferrédoxine (Fdx)	+ Jusqu'à 5 atomes de soufre fixés sur Fdx
BioB	+ Jusqu'à 3 atomes de soufre
SufB*	+ Nombreux atomes de soufre
Rubrédoxine	-
SufC	-
SufD	-
Protéine H	-

Tableau I-2: résultats du transfert de soufre depuis SufSE pour chaque protéine étudiée comme potentiel accepteur. « + » indique q'un transfert de soufre a eu lieu, « - » indique qu'il n'y a pas eu de transfert.
* résultat déjà publié (Layer *et al.*, 2007).

Le spectre de masse enregistré pour la protéine IscA après incubation avec SufSE et de la L-cystéine libre est comparable à celui obtenu dans le cas de SufA (voir figure I-14). Ceci démontre que SufSE est capable de transférer du soufre à une autre protéine de type A ne faisant pas partie de l'opéron *suf*. D'autre part, ce résultat permet de mettre en évidence que IscA peut fixer du soufre, dans les mêmes proportions que SufA.

Comme décrit dans le tableau I-2, les analyses révèlent également que SufSE peut transférer du soufre à la ferrédoxine, mais pas à la rubrédoxine, ni aux protéines SufC, SufD ou H.

I-3-4-c- Conclusion

Les expériences ont montré que SufA accepte du soufre de différentes cystéine désulfurases. D'autre part, SufSE est capable de transférer du soufre à différentes protéines, ces dernières présentant toutefois une caractéristique commune : elles possèdent toutes des résidus cystéines intervenant dans la coordination d'un centre [Fe-S]. Les protéines SufD, SufC et la protéine H ne fixent pas de soufre même si elles possèdent des résidus cystéines accessibles. Fait intéressant, nous avons pu remarquer qu'une protéine possédant des résidus cystéines intervenant dans la coordination d'un centre à fer mononucléaire (cas de la rubrédoxine) n'est pas capable de former des persulfures au niveau de ces cystéines (peut-être ont-elles un caractère nucléophile moins prononcé ?). Il semble donc que ce soit une propriété réservée aux protéines [Fe-S].

En conclusion, le transfert de soufre n'est pas spécifique à deux protéines particulières, mais nécessite néanmoins un donneur physiologique, c'est-à-dire une enzyme ayant une activité cystéine désulfurase (je rappelle que SufA ne fixe pas de soufre à partir d'une solution de Na_2S), et une métalloprotéine à centre [Fe-S] comme accepteur, dont les cystéines ont pour rôle de lier le cluster.

I-3-5- Etude d'interactions entre SufSE et SufA

Nous venons de mettre en évidence un transfert de soufre de SufSE à SufA. Il a précédemment été rapporté que SufS et SufE interagissent fortement entre elles ($K_d = 0,36 \mu\text{M}$), par l'intermédiaire de liaisons non covalentes (Layer *et al.*, 2007; Loiseau *et al.*, 2003). Nous avons ici cherché à déterminer si SufA forme un complexe avec SufS/E. Dans ce contexte, il est à noter que des expériences réalisées *in vivo* ont montré que SufA n'interagissait avec aucune protéine de l'opéron *suf*. Nous avons utilisé une approche spectroscopique (spectrométrie de masse) et biochimique (chromatographie d'affinité) pour cette étude.

Tout d'abord, à partir d'une expérience réalisée en conditions stoechiométriques, aucune entité ayant une masse moléculaire importante (environ 76000 Da) et résultant de l'existence d'un complexe covalent entre le donneur de soufre, le complexe SufSE, et la protéine acceptrice, SufA, n'a pu être mise en évidence lors des analyses de spectrométrie de masse.

D'autre part, les interactions entre les protéines SufA, SufE et SufS ont été étudiées par chromatographie d'affinité (figure I-17). Les protéines SufE, SufS et le complexe SufSE, possédant chacun(e) une étiquette polyhistidine, ont été chargés séparément sur une colonne d'affinité (Nickel chelating Sepharose) ; la protéine SufA_{STOP} est alors déposée sur ces colonnes. Après un lavage abondant, contenant les protéines non retenues, les protéines ayant interagit avec la colonne sont éluées à l'aide d'une solution contenant de l'imidazole, et les fractions récupérées analysées sur gel d'électrophorèse SDS. Dans chaque cas, la protéine SufA n'est présente que dans les fractions de lavage et n'a donc pas été retenue sur les colonnes, ce qui signifie qu'elle n'a pas interagit avec SufS et/ou SufE, chargées sur ces colonnes. Ceci suggère qu'il n'existe pas d'interactions entre SufA et SufS et/ou SufE, ou bien que les interactions entre ces protéines sont trop faibles pour pouvoir être observées par cette technique.

Enfin, on peut faire remarquer qu'une chromatographie d'exclusion stérique (Superdex-75) d'un mélange protéique contenant SufA, SufE et SufS n'a pas non plus permis de mettre en évidence un complexe entre SufA et SufS et/ou SufE.

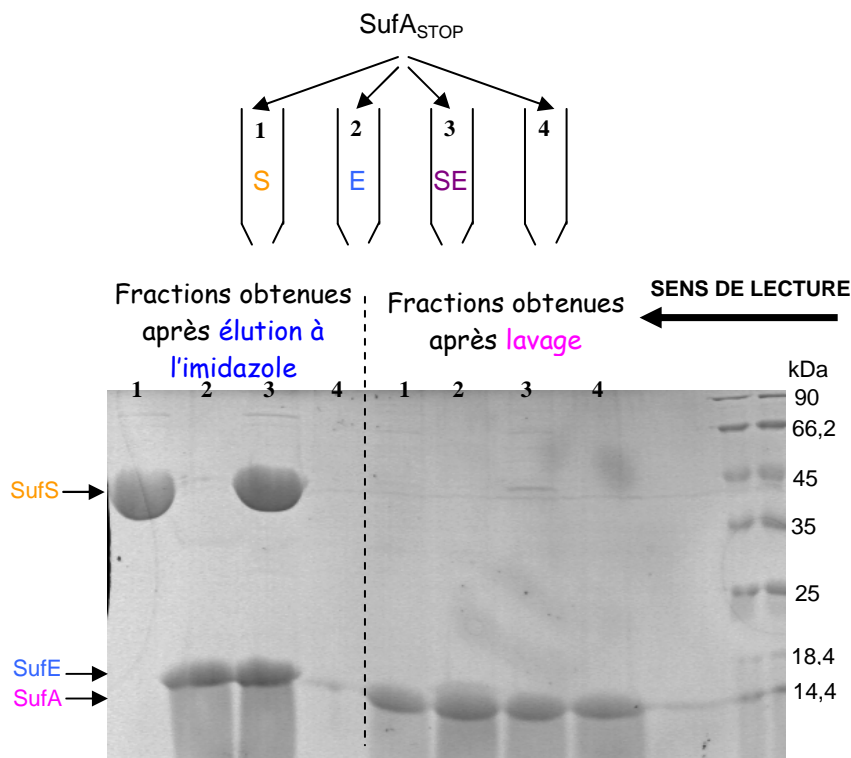


Figure I-17 : gel de polyacrylamide 15 % en conditions dénaturantes présentant la fraction protéique récupérée après lavage de la colonne (fractions 1, 2, 3, 4), et après élution à l'imidazole (fractions 1', 2', 3', 4').

II- Détermination des sites de fixation du soufre

Le transfert de soufre de SufE à SufA ayant été établi, nous avons ensuite cherché à déterminer les sites de fixation des atomes de soufre au sein de SufA. Les précédents résultats de spectrométrie de masse ont montré que l'ajout de DTT sur la forme de SufA chargée en soufre conduisait à l'obtention de la forme apo de la protéine. Ceci suggère que les atomes de soufre sont présents sur SufA sous forme de persulfures/polysulfures et sont donc, a priori, fixés sur des résidus cystéines. Je rappelle que SufA ne possède que 3 cystéines dans sa séquence en acides aminés, celles-ci étant conservées. L'objectif est donc de savoir au niveau de quels résidus cystéines sont localisés les atomes de soufre. Pour cela, différentes techniques, biochimiques et spectroscopiques, ont été utilisées. De fait, deux types d'expériences ont été réalisées : nous avons tout d'abord étudié, par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF, la fixation du soufre sur les protéines SufA mutées pour chacune des cystéines conservées (SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}) ; puis, dans un deuxième temps, nous avons analysé la forme soufrée de SufA sauvage par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

II-1- Etude de la fixation de soufre sur SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S}

Chaque simple mutant SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} a été mis en présence du complexe SufSE, soit en conditions catalytiques, soit en conditions « stoechiométriques », comme cela a été décrit pour la protéine sauvage, puis analysé par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF. Quelles que soient les conditions utilisées (stoechiométriques ou catalytiques), nous avons observé les mêmes résultats.

Après réaction, le spectre de masse du mutant SufA_{C50S} (voir annexe 1) est comparable à celui présenté précédemment pour la protéine sauvage (voir figure I-14). En effet, trois pics supplémentaires indiquant la fixation de 1, 2 ou 3 atomes de soufre apparaissent, en plus de celui correspondant à la forme apo de la protéine. De plus, les proportions relatives des différentes formes, calculées selon la méthode décrite précédemment (voir paragraphe I-3-1), sont du même ordre de grandeur que celles observées dans le cas de la protéine sauvage, les expériences avec les deux protéines ayant été réalisées le même jour dans les mêmes conditions (figure I-18 « WT » et « C50S »). Ainsi, comme le montre la figure I-18, l'échantillon « C50S » contient un mélange de forme apo (30 %), de forme ayant fixé 1 atome de soufre (43 %), 2 atomes de soufre (20 %) et 3 atomes de soufre (7 %). Cette analyse

quantitative permet d'estimer la fixation de soufre sur la protéine SufA_{C50S} à environ 1,1 atomes de soufre par monomère (contre 1,3 atomes de soufre pour la protéine sauvage lors de cette expérience). Au premier abord, ce résultat suggère que la cystéine 50 n'est pas impliquée dans la fixation du soufre. D'autre part, ce résultat indique qu'un résidu cystéine peut fixer plus d'un atome de soufre, puisque SufA peut accepter jusqu'à 3 atomes de soufre répartis sur 2 résidus cystéines restantes seulement (Cys114 et Cys116) et montre donc l'existence de persulfures et polysulfures sur SufA.

Les spectres de masse des deux autres mutants sont radicalement différents (annexe 1). En effet, après incubation avec le donneur de soufre, le complexe SufSE, la forme apo des protéines SufA_{C114S} ou SufA_{C116S} est très largement majoritaire (78 %) (figure I-18 « C114S » et « C116S »). Ces deux mutants ne peuvent donc fixer du soufre qu'en très faible quantité (environ 0,2 atome de soufre par monomère) : on peut d'ores et déjà dire que les deux cystéines C-terminales sont les sites accepteurs de soufre. De plus, il est intéressant de remarquer que ces deux résidus Cys114 et Cys116 semblent fonctionner de pair : en effet, lorsqu'une des deux cystéines C-terminales est mutée, la deuxième ne fixe pratiquement pas de soufre.

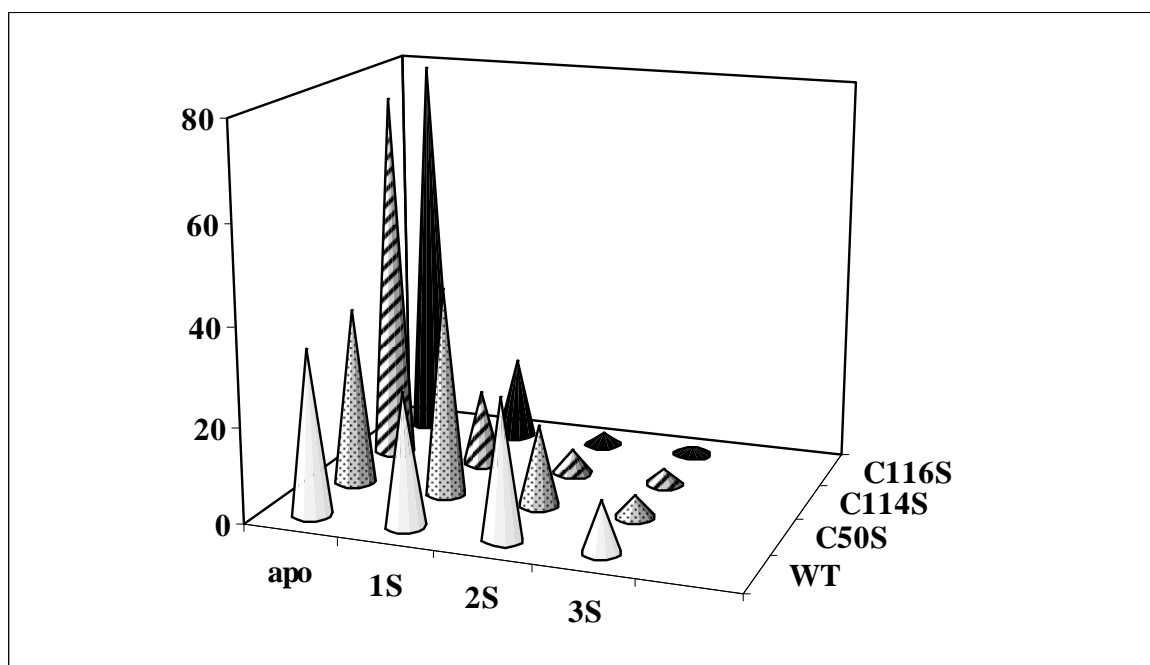


Figure I-18 : représentation des quantités relatives des différentes formes de protéine présentes après incubation de SufA (protéines sauvage « WT » et mutantes) avec SufSE-SSH

II-2- Etude de la fixation de soufre par spectrométrie MALDI-TOF

Les expériences précédentes suggèrent fortement que le soufre est localisé sur les cystéines Cys114 et Cys116. Cependant, afin de parfaitement identifier et caractériser les sites de fixation du soufre sur SufA, nous avons analysé les peptides issus de la digestion enzymatique de SufA-SSH. Pour cela, nous nous sommes inspirés du protocole décrit par Wright et coll. et résumé dans la partie Matériels et Méthodes (Wright *et al.*, 2006) : ainsi, la forme soufrée de SufA sauvage a été digérée par l'endoprotéinase-Lys C, et les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La liste des peptides résultant de la digestion est donnée dans le tableau I-3 : parmi ces peptides, un contient la cystéine Cys50 (peptide 3) et un autre contient les deux cystéines C-terminales, Cys114 et Cys116 (peptide 7).

Peptide (n°)	séquence des peptides	position	masse moléculaire (Da)
1	MDMHSGTFNPQDFAWQGLTLTPAAAIHIRELVAK	1-34	3766,88
2	QPGMVGVRLLGVK	35-46	1240,72
3	QTG C AGFGYVLDSVSEPK	47-65	1972,89
4	DDLLEHHDGAK	66-76	1259,59
5	LFVPLQAMPFIDGTEVDFVREGLNQIFK	77-104	3223,68
6	FHNPK	105-109	642,33
7	AQNE C G C GESFVGLEHHHHHH	110-130	2366,51

Tableau I-3 : séquence des peptides obtenus après digestion enzymatique de SufA-SSH par l'endoprotéinase-LysC

L'analyse du peptide 7 montre l'ajout de 1 et 2 atomes de soufre, confirmant que les deux cystéines C-terminales sont des sites accepteurs de soufre. D'autre part, le spectre de masse du peptide 3 montre l'ajout d'un atome de soufre. Ainsi, contrairement à ce que laissaient penser les expériences précédentes analysées par ESI-Q-TOF, le résultat présent montre que la cystéine conservée Cys50 est aussi un site accepteur de soufre.

Finalement, l'ensemble de ces résultats peut être interprété de la façon suivante :

- Les trois cystéines Cys50, Cys114 et Cys116 sont les sites uniques de fixation du soufre durant la réaction de transfert depuis le complexe SufSE
- Lorsque la Cys50 est mutée en sérine, des espèces polysulfures peuvent être générées sur les cystéines C-terminales
- Les cystéines C-terminales acceptent du soufre par transfert direct depuis le complexe SufSE alors que la Cys50 fixe du soufre après transfert interne via les Cys114 et Cys116.

Discussion

Nous avons pu montrer par des analyses de spectrométrie de masse couplées à des expériences de mutagenèse dirigée, que SufA est capable de fixer plusieurs atomes de soufre, localisés spécifiquement au niveau de ses trois résidus cystéines conservés, fortement supposés, je le rappelle, être impliqués dans la coordination d'un cluster [Fe-S] et définis comme le site actif de la protéine. Cette observation n'est pas tout à fait nouvelle. En effet, la mobilisation de soufre par une protéine scaffold au niveau de ses cystéines conservées a été précédemment mis en évidence par Johnson et coll (Smith *et al.*, 2001). Cette équipe a montré, en utilisant la spectrométrie de masse, que la protéine IscU d'*A. vinelandii* est capable de fixer plusieurs atomes de soufre après incubation avec la cystéine désulfurase IscS et de la cystéine libre (Smith *et al.*, 2001). Récemment, elle a décrit que les trois simples mutants Cys→Ala peuvent fixer également plusieurs atomes de soufre, de la même manière que la protéine sauvage. Il a donc été démontré que dans le cas de IscU d'*A. vinelandii*, chacune des trois cystéines peut être soufrée indépendamment des deux autres (Smith *et al.*, 2005a). Ce point constitue une différence majeure entre les deux protéines (IscU et SufA), puisque d'une part, seules les cystéines C-terminales de SufA d'*E. coli* acceptent du soufre par transfert direct depuis le complexe SufSE, alors que la cystéine Cys50 semble fixer du soufre après transfert interne via les cystéines Cys114 et Cys116 ; et d'autre part, les cystéines C-terminales de SufA fonctionnent de pair : la présence des deux est nécessaire à la fixation du soufre. Ce comportement original laisse suggérer, d'emblée, que les cystéines Cys114 et Cys116 sont les sites de fixation de persulfures/polysulfures atypiques. Ce point sera plus amplement discuté dans le chapitre IV, après avoir étudié la réactivité des

persulfures/polysulfures sur SufA vis-à-vis d'agents alkylants. En revanche, il est difficile d'expliquer les différences de comportement entre la cystéine Cys50 et les cystéines C-terminales (Cys114 et Cys116). Dans ce contexte, il faut d'ailleurs noter que l'hypothèse d'un transfert interne entre les cystéines C-terminales et la cystéine Cys50 est l'interprétation logique des résultats obtenus en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. En effet, on a pu remarquer que la cystéine Cys50 est capable de fixer du soufre mais que lorsque ce résidu est absent, SufA fixe du soufre dans des proportions comparables à celles de la protéine sauvage ; ceci suggère que dans ce cas, il se produit une accumulation de soufre sur les cystéines C-terminales. Toutefois, cette question mériterait peut-être d'être plus amplement étudiée sachant que les cystéines Cys114 et Cys116 sont distantes de plus de 15 Å de la cystéine Cys50, ce qui représente une distance assez importante pour un transfert de soufre entre ces résidus.

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, nos résultats montrent que plusieurs atomes de soufre peuvent être fixés sur une même cystéine. L'existence de ces polysulfures a déjà été observée dans de nombreux cas. IscU d'*A. vinelandii* est capable de fixer jusqu'à 5 atomes de soufre répartis sur ses trois résidus cystéines (Smith *et al.*, 2005a) ; SufE et CsdE d'*E. coli* peuvent mobiliser respectivement 5 et 2 atomes de soufre sur une seule cystéine (Loiseau *et al.*, 2005; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2003). La question que l'on peut se poser est alors de savoir si ces entités polysulfures ont une réelle signification physiologique ou bien si elles sont dues aux conditions expérimentales *in vitro* qui ne permettent pas de contrôler de façon stricte les réactions de sulfuration.

Aucun complexe covalent entre SufA et SufSE n'a été mis en évidence par spectrométrie de masse lors des expériences de transfert de soufre. De plus, d'après les expériences de chromatographie d'affinité réalisées, il semble qu'il n'existe pas d'interactions entre SufA et SufS et/ou SufE. Il aurait été intéressant d'étudier l'existence d'éventuelles interactions non covalentes entre SufA et le complexe SufSE lorsque ce dernier est soufré. Toutefois, cette expérience n'a pas été tentée puisque nous avons observé que les persulfures/polysulfures sur SufSE ne sont pas stables sur colonne chromatographique (voir paragraphe I-2-2). A partir de nos résultats, il apparaît que le transfert de soufre entre SufSE et SufA ne nécessite pas d'interactions fortes entre les protéines. Cette observation est cohérente avec le fait que SufA soit capable d'accepter du soufre de plusieurs cystéines désulfurases, et inversement, que SufSE puisse transférer du soufre à différentes protéines.

Tout ceci suggère que le transfert de soufre n'est pas régi par des interactions spécifiques entre SufSE et SufA. Ceci a déjà été proposé dans le cas de IscS et IscU d'*A. vinelandii* (Smith *et al.*, 2005a). En effet, bien que, dans ce cas, un complexe covalent ait été mis en évidence entre les deux protéines, celui-ci n'est pas une nécessité absolue pour le transfert de soufre de IscS à IscU, qui se produit même en absence de formation de ce complexe. Johnson et coll. montrent ainsi que la formation du complexe IscS/IscU et la fixation de soufre sur les cystéines conservées de IscU sont deux phénomènes indépendants (Smith *et al.*, 2005a).

On peut alors s'interroger sur la fonction de SufE en tant que donneur de soufre spécifique à SufA *in vivo*. SufE est très certainement le partenaire privilégié de SufA lors du transfert de soufre, mais il est envisageable que d'autres cystéines désulfurases (telles que IscS) prennent le relais en cas de défauts au niveau du complexe SufSE. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'aucune interaction entre SufA et SufSE n'a été démontrée *in vivo*. Dans ce contexte, il aurait été intéressant de voir si un opéron *suf*, délété au niveau des gènes *sufS* et *sufE* mais comportant un gène *iscS* est capable de rendre la protéine SufA fonctionnelle (transfert de soufre à SufA et assemblage du cluster [Fe-S]). Pour terminer, il faut mentionner qu'aucune étude cinétique n'a été réalisée afin de voir si le transfert de soufre à SufA est plus rapide depuis SufSE que depuis une autre cystéine désulfurase.

Enfin, nous avons montré que différentes protéines sont capables de fixer du soufre après transfert depuis le complexe SufSE. Ces protéines présentent tout de même une caractéristique commune : elles possèdent toutes des résidus cystéines identifiés comme étant les ligands d'un centre [Fe-S] (stable ou transitoire). Ainsi, on peut supposer que toutes les protéines amenées à devenir des protéines [Fe-S] sont capables de fixer du soufre au niveau des résidus cystéines impliqués dans la coordination du centre, sous forme de persulfures/polysulfures. Il est alors tentant de proposer que les persulfures sont des intermédiaires réactionnels dans la réaction de formation des centres [Fe-S]. Ceci implique bien entendu que les atomes de soufre des persulfures (au degré d'oxydation 0) doivent être réduits par la suite pour être présents sous forme de sulfures (degré d'oxydation -2) au sein des clusters [Fe-S]. Des systèmes réducteurs physiologiques tels que la thiorédoxine ou la glutarédoxine pourraient peut-être permettre cette étape. Toutefois, cette hypothèse (persulfuration des protéines cibles puis formation d'un centre [Fe-S]) pose le problème de l'intérêt des protéines scaffold. Quel serait leur rôle si les protéines cibles sont capables de se maturer seules en utilisant une cystéine désulfurase et de la cystéine comme source de soufre et une source de fer (encore indéterminée) ? Tout d'abord, nous ne disposons d'aucune

donnée cinétique. Il est possible que les protéines scaffold se persulfurent plus vite qu'une protéine cible. D'autre part, comme cela a déjà été proposé dans la littérature, l'assemblage d'un centre [Fe-S] par reconstitution chimique au sein d'une protéine scaffold est bien plus rapide qu'au sein d'une protéine cible, telle que la ferrédoxine (Bonomi *et al.*, 2005). En résumé, on peut proposer que les protéines scaffold sont importantes pour une maturation rapide et efficace des protéines cibles. Elles possèdent peut-être un centre [Fe-S] déjà assemblé, prêt à être transféré selon les besoins de la cellule. D'ailleurs, une mutation du gène *isa1* ou *isa2* chez la levure entraîne une diminution de l'activité des protéines [Fe-S] mitochondriales (Jensen and Culotta, 2000). Le fait que les cystéines ligands des centres [Fe-S] au sein des protéines cibles soient capables de se persulfurer indique tout de même que ces cystéines sont nucléophiles et il est possible que cela constitue une indication sur leur capacité à lier un centre [Fe-S].

Partie I

Chapitre III

Etude de la fixation du fer sur SufA

Introduction

Nous avons cherché, par le biais des expériences présentées dans ce chapitre, à étudier la fixation du fer dans SufA. Cette étude, je le rappelle, visait à déterminer si le fer était le premier élément incorporé au niveau du site actif de SufA lors de l'assemblage des centres [Fe-S]. On peut d'ores et déjà mentionner que ce point avait été abordé, par d'autres équipes, dans le cas de IscU de *T. maritima* ou d'*A. vinelandii*, sans résultats concluants (Nuth *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2001).

I- Etude de la fixation de Fe(II) sur SufA

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, le donneur physiologique de fer chez la bactérie n'a toujours pas été clairement identifié. C'est pourquoi, pour toutes les expériences, nous avons choisi d'apporter le fer ferreux sous forme chimique (sel de Mohr $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$). D'autre part, les expériences ont été réalisées en conditions anaérobies afin d'éviter l'oxydation du Fe^{2+} .

I-1- Caractérisation biochimique et spectroscopique

I-1-1-Dosages colorimétriques

La protéine SufA_{his} (500 μM) a été traitée avec différents excès de fer ferreux en présence de DTT (3 mM), en conditions anaérobies. Après purification sur colonne NAP10, permettant d'éliminer l'excès de fer et de DTT, un dosage de fer a été effectué pour chacun des échantillons afin de déterminer la quantité de fer s'étant fixée à la protéine. Les résultats montrent que SufA est capable de fixer plusieurs atomes de fer (Fe^{2+}) par monomère. D'autre part, on remarque que plus l'excès de fer est important lors de l'incubation, plus la quantité de fer fixée à SufA est importante. Typiquement, après incubation avec 4 excès molaires de fer par rapport à SufA, cette dernière fixe 1,8 atomes de fer par monomère. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau I-4.

La forme de SufA_{his} ainsi obtenue (traitée avec 4 excès de Fe(II) en conditions anaérobies) sera notée par la suite **SufA-Fe**.

Excès molaire de fer par rapport à SufA _{his} (monomère) lors de l'incubation	Fer dosé dans SufA _{his} après dessalage (fer/monomère)
2	1,04
4	1,8
8	3,2
18	12

Tableau I-4 : quantité de fer dosée dans SufA_{his} pour différents excès de Fe(II) ajoutés lors de l'incubation

I-1-2- Spectroscopie UV-visible

Les formes de SufA chargées en fer ont été caractérisées par spectroscopie UV-visible. Les spectres comportent une bande d'absorption marquée à 320 nm et des épaulements à 430 nm et 500 nm (figure I-19).

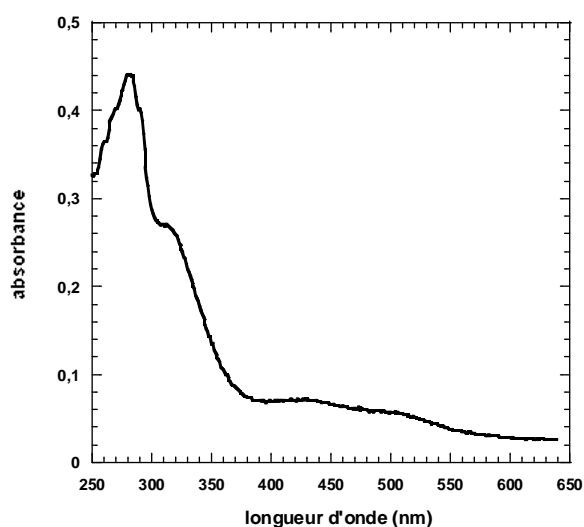


Figure I-19 : spectre UV-visible de SufA_{his} (30 µM) après incubation avec 4 excès molaires de Fe(II) et purification sur NAP10

I-1-3- Spectroscopie Mössbauer

La forme SufA-Fe a ensuite été analysée par spectroscopie Mössbauer. Cette technique spectroscopique nous permet d'étudier non seulement la nature du centre métallique mais aussi l'environnement du fer présent dans la protéine.

I-1-3-a- Etude de la forme SufA-Fe

La forme SufA-Fe est obtenue, je le rappelle, après traitement de la protéine avec 4 excès molaires de Fe(II), en présence de DTT. Pour l'analyse par spectroscopie Mössbauer, la source de fer utilisée pour la préparation de l'échantillon est du $^{57}\text{Fe(II)}$ introduit sous forme de sel de Mohr.

Le spectre Mössbauer obtenu, enregistré à 105 K, est présenté en figure I-20 (spectre du haut). Il est composé de 4 doublets dont les paramètres sont reportés dans le tableau I-5. Ces paramètres indiquent que les doublets A et B correspondent à du Fe(II) haut spin coordonné soit par des atomes d'azote, soit par des atomes d'oxygène, dans un environnement octaédrique. Ils représentent 75 % du fer total. Le doublet C peut être attribué à du Fe(II) haut spin coordonné par des atomes de soufre dans un environnement tétraédrique. Ceci signifie qu'une partie du fer est liée par les cystéines conservées de SufA, ou bien qu'il reste du DTT complexé avec le fer dans l'échantillon. Quoi qu'il en soit, il faut noter que cette espèce ne représente que 19 % du fer total et n'est donc pas l'espèce majoritaire. Enfin, la participation du doublet D est minime (6 % du fer total) ; il correspond vraisemblablement à du fer ferrique, non structuré. Des résultats identiques ont été obtenus avec la protéine SufA_{STOP} (ce dernier point est développé dans le paragraphe I-4-2).

Echantillon	Doublet	Espèce correspondante	δ (mms ⁻¹)	ΔE_Q (mms ⁻¹)	Aire (%)
<i>SufA-Fe</i> <i>Forme non alkylée</i>	A	Fe ²⁺ (S=2)-octaédrique ligands N/O	1.15	3.07	59(5)
	B	Fe ²⁺ (S=2)-octaédrique ligands N/O	1.18	2.30	16(5)
	C	Fe ²⁺ (S=2)-tétraédrique ligands S	0.71(4)	3.20(6)	19(5)
	D	Fe ³⁺ Espèce inconnue	0.49(5)	0.46(10)	6(3)
<i>SufA-Fe</i> <i>Forme alkylée</i>	A	Fe ²⁺ (S=2)-octaédrique ligands N/O	1.15(3)	3.07(6)	58(3)
	B	Fe ²⁺ (S=2)-octaédrique ligands N/O	1.18(3)	2.30(6)	42(3)

Tableau I-5 : paramètres Mössbauer des différents doublets constituant les spectres des échantillons SufA-Fe non alkylé, et SufA-Fe alkylé

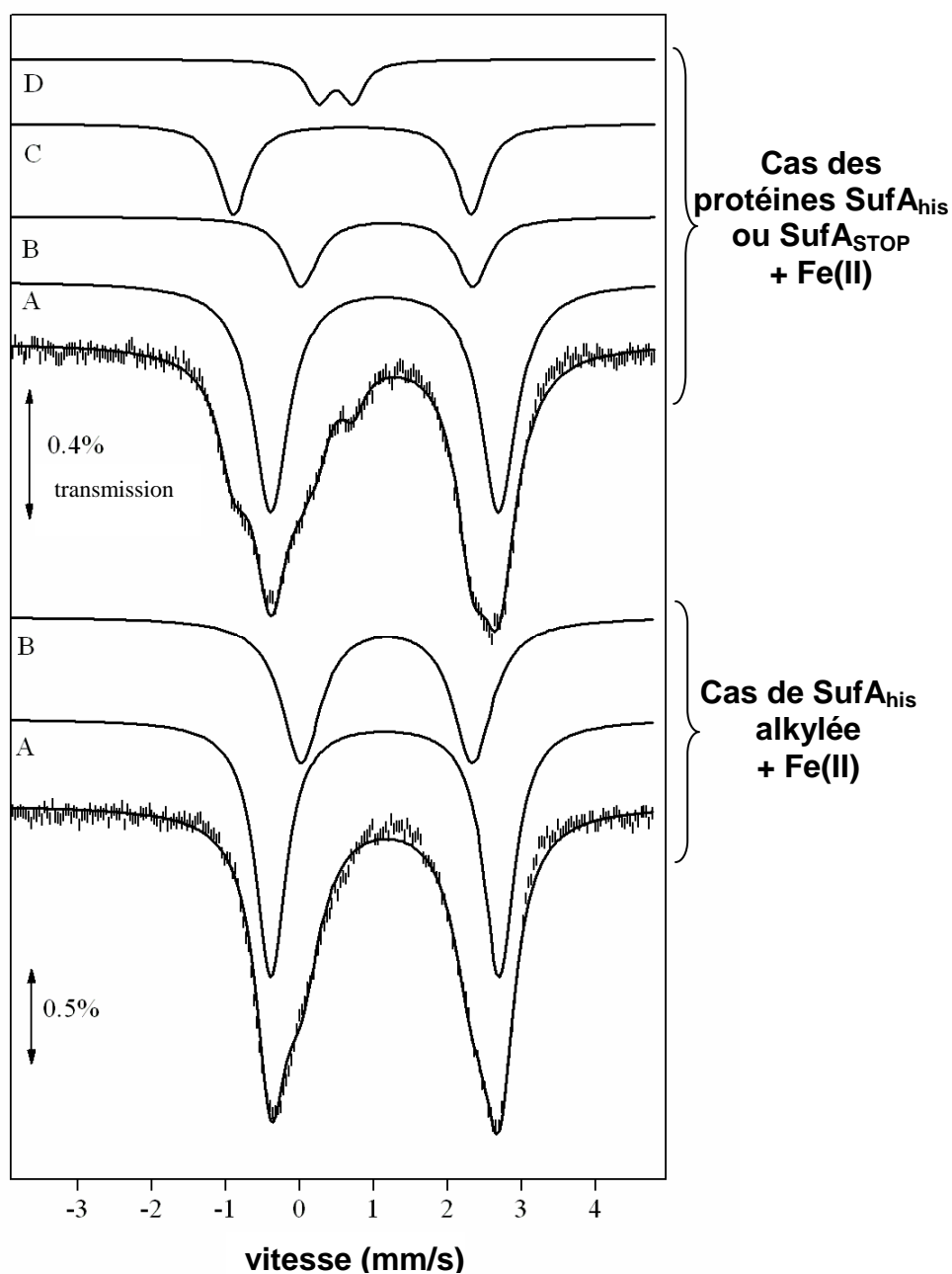


Figure I-20 : Spectres Mössbauer de la forme SufA-⁵⁷Fe (660 μ M, 1,6 fer/monomère) enregistrés à 105 K. Les spectres du haut et du bas correspondent respectivement aux formes non alkylée et alkylée de SufA.

I-1-3-b- La protéine SufA-Fe alkylée

Afin de mieux caractériser l'implication des résidus cystéines de SufA dans la coordination du fer (Fe^{2+}), nous avons étudié la fixation du fer ferreux sur SufA après avoir bloqué ses cystéines par un agent alkylant, l'iodoacétamide, qui réagit spécifiquement avec les fonctions thiols. La réaction, de type substitution nucléophile $\text{S}_\text{N}2$, provoque le départ de l'iode et la formation d'une liaison covalente entre le soufre et l'acétamide, comme cela est schématisé ci-dessous (figure I-21). Dans le cas des protéines, l'iodoacétamide peut donc réagir avec les résidus cystéines, conduisant à leur inactivation.

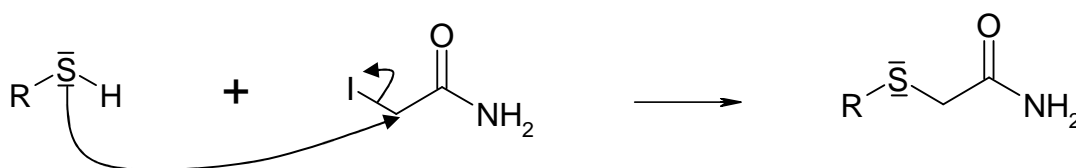


Figure I-21 : schéma mécanistique de la réaction entre un groupement thiol et l'iodoacétamide. Dans le cas des protéines, R désigne la protéine et -SH, une cystéine.

Ainsi, la protéine SufA_{his}, préalablement traitée au DTT, a été incubée avec un excès d'iodoacétamide, comme décrit dans Matériels et Méthodes. L'alkylation totale des trois cystéines a été vérifiée par spectrométrie de masse : le spectre (figure I-22) montre la présence d'un pic unique de masse $M=14536$ Da correspondant à la masse de SufA (14365 Da) additionnée de la masse de 3 groupements acétamide ($3 \times 57 = 171$ Da). Il est important de rappeler que SufA ne possède pas d'autres résidus cystéines que les cystéines Cys50, Cys114 et Cys116.

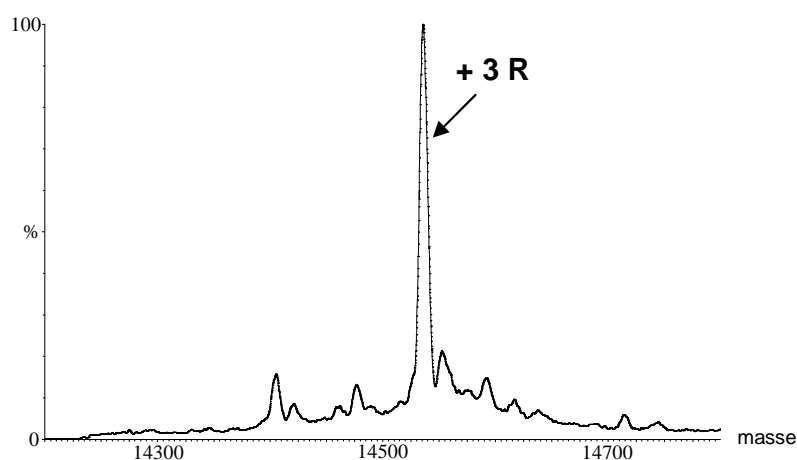


Figure I-22 : spectre de masse reconstruit de SufA_{his} (500 nM) après alkylation par l'iodoacétamide ; R correspond à un groupement acétamide (CH_2CONH_2)

Cette forme de protéine, pour laquelle les trois cystéines ont été bloquées par réaction avec l'iodoacétamide, a ensuite été incubée avec 4 excès de Fe(II). Après dessalage, le dosage de fer révèle la présence de 1,7 atomes de fer par chaîne polypeptidique, ce qui est identique à la valeur obtenue pour la forme non alkylée de SufA (SufA-Fe, 1,8 atomes de fer par monomère). De plus, le spectre UV-visible de la forme SufA alkylée chargée en fer obtenue ici est identique à celui de la forme SufA-Fe non alkylée (figure I-19). Ce résultat tend à suggérer que les cystéines de SufA ne sont pas impliquées dans la fixation du fer.

La forme SufA-Fe alkylée (préparée avec du $^{57}\text{Fe}^{2+}$) a ensuite été caractérisée par spectroscopie Mössbauer. Le spectre enregistré à 105 K (figure I-20, spectre du bas) est constitué uniquement de deux doublets A et B, dont les paramètres sont notés dans le tableau I-5. Ces doublets correspondent aux doublets A et B observés dans le cas de la protéine non alkylée (décrite dans le paragraphe précédent) et sont caractéristiques de Fe(II) haut spin coordiné soit par des atomes d'azote, soit par des atomes d'oxygène, dans un environnement octaédrique. Aucun autre doublet indiquant la présence de fer coordiné par des atomes de soufre n'est observé. Je rappelle que, dans cet échantillon, les cystéines conservées de SufA sont bloquées par des groupements acétamide. Ceci suggère que l'espèce C identifiée dans le cas de la protéine SufA-Fe non alkylée correspond à du fer ferreux coordiné par des résidus cystéines de la protéine. Toutefois, cette espèce était minoritaire, ce qui montre que la participation des cystéines dans la coordination du fer est minime.

I-1-3-c- Conclusion quant à la localisation du Fe(II)

L'ensemble des analyses de spectroscopie Mössbauer nous permet de conclure que les résidus cystéines constituant le site actif de la protéine ne sont que marginalement impliqués dans la fixation du Fe(II). Ce dernier est coordiné majoritairement par des atomes d'azote et d'oxygène (environ 80 %).

I-2- Effet de l'EDTA

Afin de mieux caractériser la fixation du fer ferreux sur SufA, nous avons testé l'influence de l'EDTA, un chélateur de fer. Ainsi, la protéine (500 μM), après incubation avec le fer (2 à 8 excès molaires de Fe^{2+}), en présence de DTT (3 mM), a été traitée avec différents excès d'EDTA, en conditions anaérobies. Tout d'abord, on remarque que les bandes

d'absorption observées sur le spectre UV-visible correspondant à SufA chargée en fer tendent à disparaître avec l'ajout d'EDTA (figure I-23, spectre en pointillé), suggérant une perte de fer. En effet, les dosages de fer, réalisés après purification de la protéine sur colonne NAP10, révèlent que la quantité de Fe(II) au sein de SufA diminue rapidement quand la quantité d'EDTA augmente (figure I-24). En fait, l'ajout d'un équivalent d'EDTA par rapport au fer suffit à obtenir une protéine SufA quasiment dépourvue de fer. Ainsi, comme le montre la figure I-24, si SufA est traitée avec 4 excès molaires de fer puis 4 excès molaires d'EDTA, il reste environ 0.2 atome de fer par chaîne polypeptidique après dessalage. Tout ceci démontre que les atomes de fer(II) fixés dans SufA sont facilement chélatables.

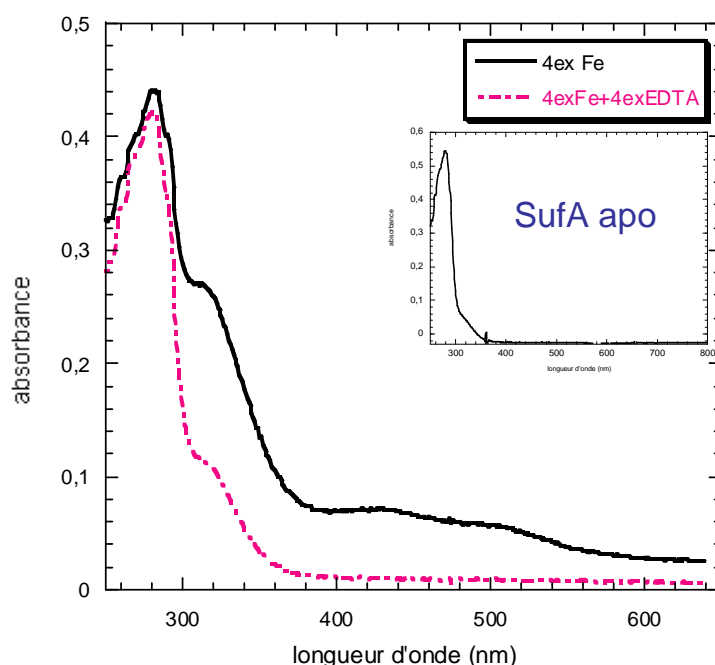


Figure I-23 : spectre UV-visible de SufA_{his} (30 μ M) après incubation avec 4 excès molaires de Fe(II) puis 4 excès molaires d'EDTA et dessalage (spectre en pointillé) ; le spectre obtenu en absence d'EDTA est représenté de nouveau (spectre continu) pour faciliter la comparaison. Le spectre de la protéine SufA apo (35 μ M) est représenté en insert pour référence.

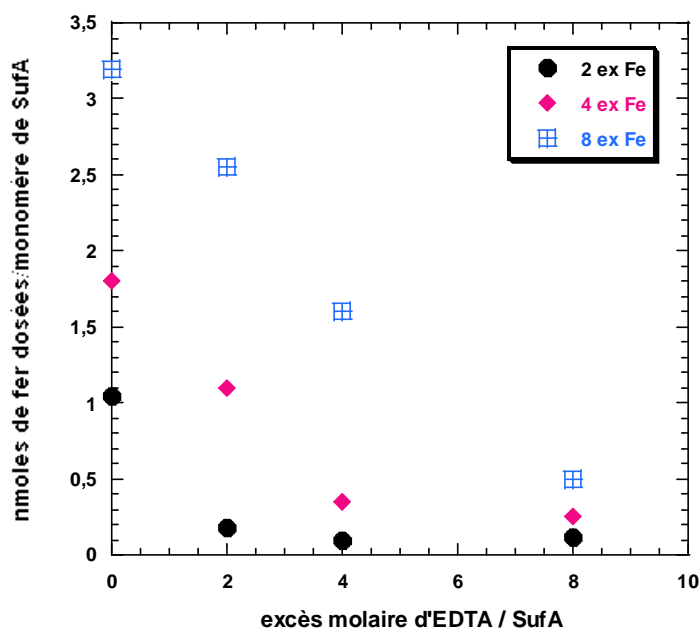


Figure I-24 : quantité de fer dosée dans SufA_{his} après dessalage en fonction de l'excès molaire d'EDTA par rapport à SufA ajouté.

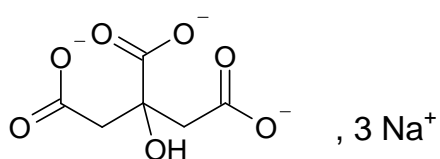
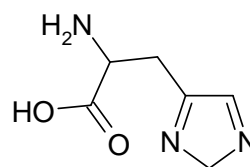
I-3- Calcul de la constante d'association de SufA_{his} pour le Fe(II)

L'ensemble de nos expériences a pu montrer que SufA est capable de fixer du fer(II). Toutefois, les atomes de fer (Fe^{2+}) ne semblent pas liés très fortement à la protéine puisque l'ajout d'un équivalent d'EDTA par rapport au fer conduit à l'obtention d'une forme de SufA contenant très peu de fer (il reste entre 0,2 et 0,5 atome de fer par monomère). Afin de quantifier l'interaction de SufA avec le Fe(II), nous avons entrepris de déterminer la constante d'association de la protéine pour le Fe(II).

Pour cela, nous avons réalisé plusieurs réactions de compétition entre la protéine SufA et différents chélateurs de fer (le citrate de sodium et l'histidine), vis-à-vis du Fe(II).

La protéine SufA chargée en fer (450 μM , 1,8 fer/monomère) a été mise en présence d'un chélateur de fer, pendant 1 heure, puis purifiée sur colonne NAP10, l'expérience étant réalisée en conditions anaérobies. Nous avons alors dosé le fer restant dans SufA pour différentes concentrations de chélateur ajouté. A partir de ces résultats, et connaissant la valeur de la constante d'association du chélateur avec le Fe(II), nous avons pu calculer la constante d'association de SufA pour le Fe(II).

Les deux chélateurs de fer qui ont été utilisés sont : le citrate de sodium et l'histidine.

**Citrate de sodium****histidine****Figure I-25** : formules chimiques des deux chélateurs de fer utilisés, le citrate de sodium et l'histidine.

Les quantités de fer dosées dans SufA après incubation avec différents excès de ces chélateurs sont reportées dans le tableau I-6, et représentées graphiquement figure I-26.

<i>Cas du citrate de sodium</i>		<i>Cas de l'histidine</i>	
Quantité de fer dans SufA (Atome de fer/monomère)	Excès de citrate par rapport au fer	Quantité de fer dans SufA (Atome de fer/monomère)	Excès d'histidine par rapport au fer
1,8	0	1,8	0
0,98	2	0,9	2
0,8	6	0,5	6
0,65	8	0,41	8
0,42	25	0,36	25
0,28	50	0,3	50

Tableau I-6 : quantité de fer dosée dans SufA pour différents excès de chélateur de fer ajoutés

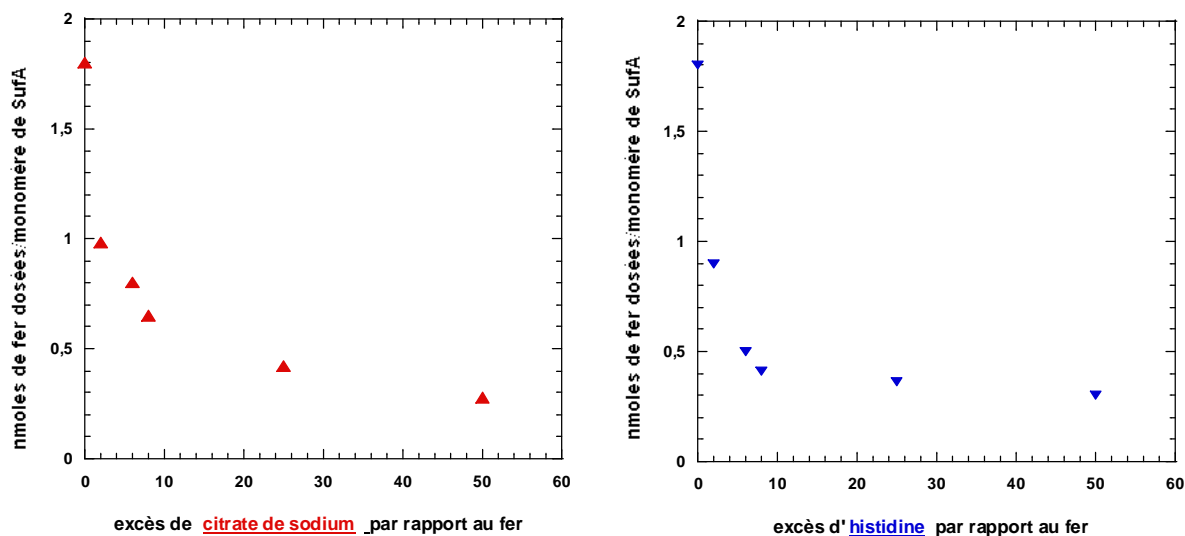


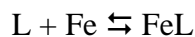
Figure I-26 : représentation graphique de la quantité de fer présente dans SufA après dessalage suivant l'excès de citrate de sodium ou d'histidine ajouté.

La démarche adoptée ainsi que la méthode de calcul utilisée pour déterminer la constante d'association de SufA avec le fer(II) sont détaillées ci-après dans le cas du citrate de sodium. Cette constante d'association, qui sera noté par la suite $\beta_{\text{Fe(II)P}}$, correspond à la réaction suivante : $\text{P} + \text{Fe} \rightleftharpoons \text{FeP}$, où P désigne la protéine SufA.

$$\text{D'où } \beta_{\text{Fe(II)P}} = \frac{[\text{FeP}]}{[\text{P}][\text{Fe}]}$$

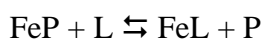
Afin de calculer $\beta_{\text{Fe(II)P}}$, nous avons considéré les réactions de compétition avec le citrate de sodium. Les deux autres réactions à considérer sont donc :

- La réaction du citrate de sodium noté L avec le Fe(II) :



Elle est définie par la constante d'association citrate/Fe(II) : $\beta_{\text{Fe(II)L}} = \frac{[\text{FeL}]}{[\text{Fe}][\text{L}]}$

- La réaction de compétition entre la protéine SufA (P) et le citrate de sodium (L) vis-à-vis du Fe(II) :



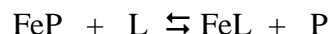
Elle est définie par la constante de compétition : $K_{\text{comp}} = \frac{[\text{FeL}][\text{P}]}{[\text{FeP}][\text{L}]}$

On peut donc déduire que $\beta_{\text{Fe(II)P}} = \frac{\beta_{\text{Fe(II)L}}}{K_{\text{comp}}}$

La constante $\beta_{\text{Fe(II)L}}$, d'après la littérature est $\beta_{\text{Fe(II)L}} = 10^{4,8} \text{ M}^{-1}$ (Field *et al.*, 1974).

La détermination de K_{comp} permet donc de calculer la valeur numérique de $\beta_{\text{Fe(II)P}}$.

Pour cela, on considère la réaction :



A l'état initial	c	n	0	0
A l'équilibre	c - x	n - x	x	x

$$\text{Or, } K_{\text{comp}} = \frac{[\text{FeL}][\text{P}]}{[\text{FeP}][\text{L}]}$$

$$\text{Avec } [\text{FeP}] = \frac{[\text{FeP}]_{\text{total, à l'équil}}}{\alpha_{\text{FeP}}}$$

$$[\text{FeL}] = \frac{[\text{FeL}]_{\text{total, à l'équil}}}{\alpha_{\text{FeL}}}$$

$$[\text{P}] = \frac{[\text{P}]_{\text{total, à l'équil}}}{\alpha_{\text{P}}}$$

$$[\text{L}] = \frac{[\text{L}]_{\text{total, à l'équil}}}{\alpha_{\text{L}}}$$

$$\text{D'où } K_{\text{comp}} = \frac{[\text{FeL}]_{\text{total, à l'équil}} \times [\text{P}]_{\text{total, à l'équil}} \times \alpha_{\text{FeP}} \times \alpha_{\text{L}}}{[\text{FeP}]_{\text{total, à l'équil}} \times [\text{L}]_{\text{total, à l'équil}} \times \alpha_{\text{FeL}} \times \alpha_{\text{P}}}$$

$$\text{Et donc } K_{\text{comp}} = \frac{x^2 \times \alpha_{\text{FeP}} \times \alpha_{\text{L}}}{(c - x)(n - x) \times \alpha_{\text{FeL}} \times \alpha_{\text{P}}}$$

Les coefficients α sont les coefficients de Ringbom : ils tiennent compte des différents états de protonation d'une espèce donnée. Ainsi, pour calculer K_{comp} , il faut tout d'abord déterminer ces coefficients pour chaque espèce.

♦ Comme nous pouvons le voir sur la figure I-25, le citrate de sodium contient une fonction alcool et trois fonctions acide carboxylique. Ainsi, par définition, on a :

$[\text{L}]_{\text{total, à l'équil}} = [\text{L}] + [\text{LH}] + [\text{LH}_2] + [\text{LH}_3] + [\text{LH}_4]$ où L correspond à la forme totalement déprotonée et LH_4 à la forme totalement protonée.

$$\begin{aligned} [\text{L}]_{\text{total, à l'équil}} &= [\text{L}] + [\text{LH}] + [\text{LH}_2] + [\text{LH}_3] + [\text{LH}_4] = [\text{L}] \left(1 + \frac{[\text{H}]}{\beta_{\text{LH}}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{\beta_{\text{LH}_2}} + \frac{[\text{H}^+]^3}{\beta_{\text{LH}_3}} + \frac{[\text{H}^+]^4}{\beta_{\text{LH}_4}} \right) \\ &= [\text{L}] \alpha_{\text{L}} \end{aligned}$$

Avec $\alpha_L = \left(1 + \frac{[H]}{\beta_{LH}} + \frac{[H^+]^2}{\beta_{LH_2}} + \frac{[H^+]^3}{\beta_{LH_3}} + \frac{[H^+]^4}{\beta_{LH_4}} \right)$ (équation 1)

Le calcul des constantes β_{LHn} fait appel aux données de la littérature. En effet, β_{LH} correspond à la réaction $H^+ + L \rightleftharpoons LH$, avec $\beta_{LH} = \frac{[LH]}{[H^+][L]}$. Cette constante est répertoriée dans les tables : $\beta_{LH} = K_1 = 10^{-10,82}$.

β_{LH_2} correspond à la réaction $2H^+ + L \rightleftharpoons LH_2$, avec $\beta_{LH_2} = \frac{[LH_2]}{[H^+]^2[L]}$

Dans ce cas, pour déterminer β_{LH_2} , il faut considérer les réactions de formations successives des formes LH et LH₂ dont les constantes K sont connues et regroupées dans des tables :

$H^+ + L \rightleftharpoons LH$ avec $K_1 = \frac{[LH]}{[H][L]} = 10^{-10,82}$, comme déjà mentionné

$H^+ + LH \rightleftharpoons LH_2$ avec $K_2 = \frac{[LH_2]}{[H][LH]} = 10^{-5,67}$

Ainsi, $\beta_{LH_2} = K_1 \times K_2 = 10^{-16,49}$

De même, β_{LH_3} correspond à la réaction $3H^+ + L \rightleftharpoons LH_3$

Et $\beta_{LH_3} = \frac{[LH_3]}{[H^+]^3[L]} = K_2 \times K_3$

Où $K_3 = \frac{[LH_3]}{[H][LH_2]} = 10^{-4,39}$ définit la réaction $H^+ + LH_2 \rightleftharpoons LH_3$

Donc, $\beta_{LH_3} = 10^{-20,88}$.

Enfin, $\beta_{LH_4} = 10^{-23,84}$, calculée suivant la même méthode.

Pour terminer, il faut noter que $[H^+] = 10^{-pH} = 10^{-8}$ M.

En reportant dans l'équation (1), on obtient :

$$\alpha_L = 1 + \frac{10^{-8}}{10^{-10,82}} + \frac{(10^{-8})^2}{10^{-16,49}} + \frac{(10^{-8})^3}{10^{-20,88}} + \frac{(10^{-8})^4}{10^{-23,84}} = 1 + 10^{2,82} + 10^{0,49} + 10^{-3,12} + 10^{-6,16} \approx 10^{2,82}$$

Or, on considère que dans nos conditions expérimentales (pH = 8), le citrate n'est pas totalement déprotoné, la fonction alcool étant toujours présente. Par conséquent la forme L

n'existe pas. La valeur de $\beta_{\text{Fe(II)L}}$, établie par McBride et coll (Field *et al.*, 1974), tient compte de cette considération. Le calcul de α montre d'ailleurs que la forme LH est majoritaire.

Ainsi, on peut négliger la forme L et poser alors $\alpha = 1$.

♦ De la même manière, $[\text{FeL}]_{\text{total, à l'équil}} = [\text{FeL}] + [\text{FeLH}] + [\text{FeLH}_2] + [\text{FeLH}_3] + [\text{FeLH}_4]$

$$= [\text{FeL}] \alpha_{\text{FeL}}, \text{ avec } \alpha_{\text{FeL}} = 1 + \frac{[\text{H}]}{\beta_{\text{FeLH}}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{\beta_{\text{FeLH}_2}} + \frac{[\text{H}^+]^3}{\beta_{\text{FeLH}_3}} + \frac{[\text{H}^+]^4}{\beta_{\text{FeLH}_4}}$$

On procède de la même manière que précédemment : tout d'abord, on utilise les constantes répertoriées dans les tables pour calculer les constantes β_{FeLH_n} . Ensuite, on considère que la forme L n'existe pas dans nos conditions expérimentales. Les valeurs déterminées sont également très faibles et on peut conclure que $\alpha_{\text{FeL}} = 1$.

♦ Au pH de travail, on considère que la protéine est uniquement sous forme protonée et ainsi $\alpha_P = 1$ et $\alpha_{\text{FeP}} = 1$.

Ceci ayant été déterminé, il reste à calculer les concentrations [P], [L], [FeP] et [FeL], pour chaque excès de citrate de sodium ajouté.

Un exemple de calcul est donné ci-dessous, pour 2 excès de citrate de sodium.

♦ c désigne la concentration initiale en FeP

La protéine P a été introduite à 450 μM et contient 1,8 fer/monomère

D'où $c = 450 \times 1,8 \cdot 10^{-6} = 8,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

♦ n désigne la concentration initiale en ligand L

$n = 8,1 \cdot 10^{-4} \times 2 = 1,62 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (car on travaille avec 2 excès de citrate par rapport au Fe)

♦ $c - x$ correspond à la concentration à l'équilibre en FeP

$= 450 \times 0,98 \cdot 10^{-6} = 4,41 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (car à l'équilibre, il reste 0.98 fer/monomère de SufA)

D'où, $x = c - 4,41 \cdot 10^{-4} = 3,69 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

♦ $n - x$ correspond à la concentration à l'équilibre en citrate de sodium

$n - x = 1,251 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Ainsi, $K_{\text{comp}} = \frac{(3,69 \cdot 10^{-4})^2}{(4,41 \cdot 10^{-4})(1,251 \cdot 10^{-3})} = 0,25$

Et $\beta_{\text{Fe(II)P}} = \frac{\beta_{\text{Fe(II)L}}}{K_{\text{comp}}} = \frac{10^{4,8}}{0,25} = 2,5 \cdot 10^5$

Les valeurs de c , n et x ont été calculées pour chaque excès de citrate de sodium ajouté. Dans chaque cas, elles conduisent à une valeur de $\beta_{\text{Fe(II)P}}$ très voisine. La moyenne de ces valeurs a été calculée. On a ainsi pu déterminer que

$$\beta_{\text{Fe(II)P}} = 5.10^5 \text{ M}^{-1}.$$

On remarque alors que $\beta_{\text{Fe(II)P}}$ et $\beta_{\text{Fe(II)L}}$ sont très proches. Ceci est cohérent avec le fait qu'il suffit d'ajouter un faible excès (2 équivalents) de citrate par rapport au fer pour enlever quasiment la moitié du fer présent initialement au sein de SufA.

Un calcul tout à fait similaire a été effectué dans le cas où le chélateur de fer utilisé était l'histidine, pour lequel $\beta_{\text{Fe(II)L}} = 10^{5,85} \text{ M}^{-1}$ (Sillen and Martell, 1964). Dans ce cas, on a pu déterminer que

$$\beta_{\text{Fe(II)P}} = 2.10^5 \text{ M}^{-1}.$$

Ainsi la constante d'association de SufA pour le Fe(II) est de l'ordre de 10^5 M^{-1} , ce qui est une valeur assez faible, comme cela a été rapporté dans les cas de la protéine Fur ($K = 5.10^4 \text{ M}^{-1}$) (Mills and Marletta, 2005) et de la protéine CyaY ($K = 1.10^5 \text{ M}^{-1}$) (Bou-Abdallah *et al.*, 2004). Ceci confirme nos précédentes conclusions, selon lesquelles le Fe(II) est faiblement lié à la protéine SufA.

I-4- Expériences complémentaires

I-4-1- Caractérisation des protéines mutées SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} et SufA_{C116A}

Dans le but d'accumuler le maximum d'informations sur la forme SufA-Fe (obtenue avec du Fe(II)), nous avons étudié la fixation du Fe(II) sur les protéines mutées SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} et SufA_{C116A}. Ainsi, les trois simples mutants Cys→Ser (500 μM) ont été traités à leur tour avec plusieurs excès de fer(II) (2 à 8 excès molaires), en présence de DTT (3 mM), et en présence ou non d'EDTA, afin de comparer leur comportement à celui de la protéine sauvage. Les dosages révèlent que ces protéines (1) sont capables de fixer du Fe(II) dans les mêmes proportions que la protéine sauvage (tableau I-7), (2) se comportent de façon comparable en présence d'EDTA (on observe une perte de 60 % du fer en présence de 0,5 équivalent d'EDTA par rapport au fer, contre une perte de 40 % dans le cas de la protéine sauvage pour un ajout initial de 4 excès molaires de Fe(II)). Toutefois, la sérine pouvant être un ligand du fer, par l'intermédiaire de la fonction alcool, nous avons répété les expériences

avec un mutant Cys→Ala. Dans ces conditions, on observe que le mutant SufA_{C116A} fixe des quantités de fer comparables à celles du mutant SufA_{C116S} et également à celles de la protéine sauvage, comme cela est présenté dans le tableau I-7.

L'ensemble de ces résultats révèle que les mutants Cys→Ser sont de bons modèles d'étude et suggère que les résidus cystéines de SufA ne participent pas à la fixation du fer, confortant donc les résultats obtenus précédemment montrant que le fer est majoritairement coordonné par des atomes d'azote et d'oxygène.

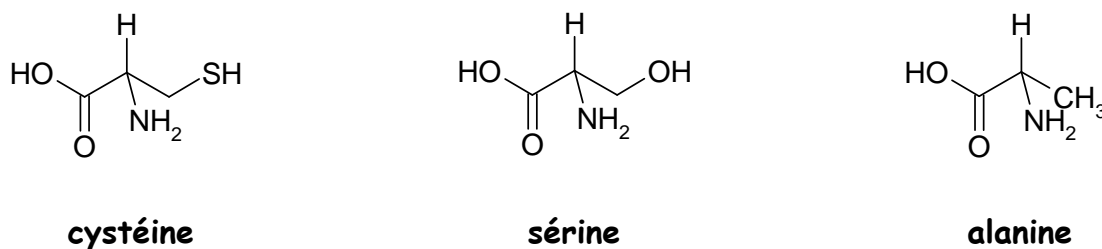


Figure I-27 : formules chimiques des acides aminés cystéine, sérine et alanine

Quantité de fer dosée dans les protéines (atomes de fer par monomère)					
protéine	SufA _{C50S}	SufA _{C114S}	SufA _{C116S}	SufA _{C116A}	SufA _{his} (protéine sauvage)
4 excès Fe(II)	2,1	1,4	2	2,1	1,8
4 excès Fe(II) + 2 excès EDTA	1,2	0,7	0,8	0,7	1,1

Tableau I-7 : quantité de fer dosée dans SufA (protéines sauvage et mutantes) après incubation avec 4 excès de Fe(II) puis 2 excès d'EDTA et dessalage

Des spectres UV-visible de chacune des protéines mutées après incubation avec le fer ont été enregistrés (figure I-28). Globalement, on remarque que, pour tous les mutants, les spectres sont différents de celui de la protéine sauvage.

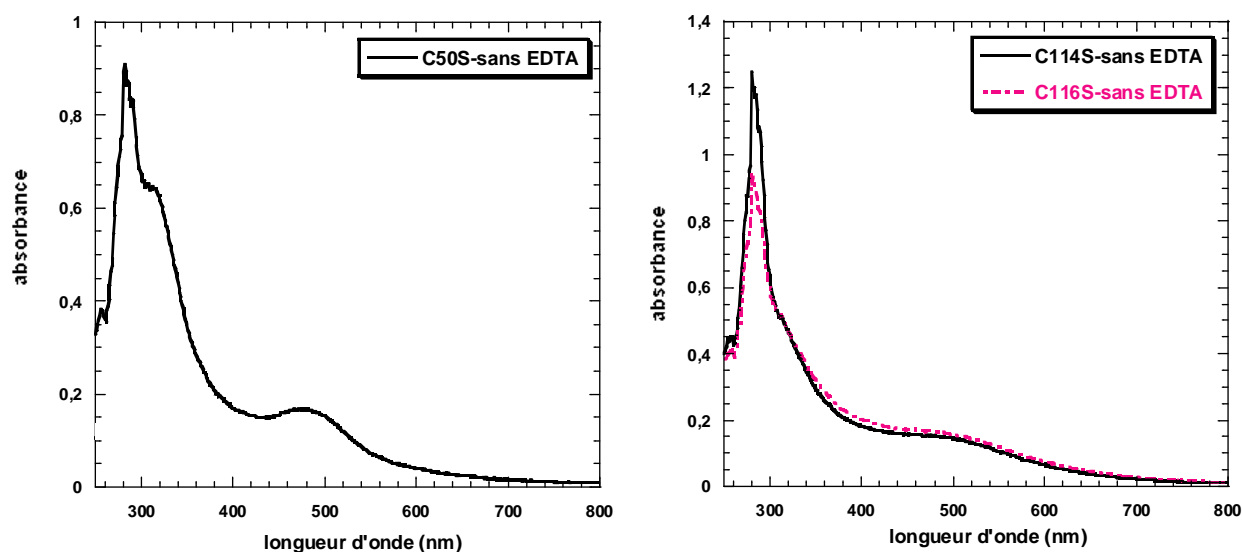


Figure I-28: spectres UV-visible des protéines SufA_{C50S} (60 μ M), SufA_{C114S} (80 μ M) et SufA_{C116S} (60 μ M) après incubation avec 4 excès molaires de Fe(II) et dessalage

Les spectres des protéines SufA_{C114S}-Fe et SufA_{C116S}-Fe, qui sont très similaires entre eux, présentent une bande d'absorption à 320 nm peu prononcée, et les épaulements à 430 nm et 500 nm ne sont plus clairement définis ; on a une absorption large entre 440 et 540 nm. Dans le cas du mutant SufA_{C50S}, la bande d'absorption à 320 nm est similaire à celle de la protéine sauvage. En revanche, on a une bande intense à 480 nm. A la vue de ces différences, on pourrait penser que les cystéines sont les ligands du fer ou du moins qu'elles sont proches du site de fixation du fer. Cette dernière hypothèse semble la plus probable compte tenu de l'ensemble des résultats précédents montrant d'une part que la mutation d'une cystéine n'affecte pas la capacité de la protéine à fixer du fer et d'autre part que les atomes de Fe(II) sont majoritairement coordonnés par des atomes d'azote et d'oxygène (voir analyses de spectroscopie Mössbauer).

I-4-2- La protéine SufA_{STOP}

Des expériences similaires ont été réalisées avec la protéine SufA_{STOP} ne possédant pas d'étiquette polyhistidine. De fait, SufA_{STOP} (500 μ M) a été traitée avec différents excès de Fe(II) et d'EDTA en conditions anaérobies. La quantité de fer dosée dans la protéine après purification sur colonne, est indiquée dans le tableau I-8. On observe alors que la protéine SufA_{STOP} fixe des quantités de Fe(II) comparables à celles dosées dans le cas de la protéine SufA_{his}, et que le comportement des deux protéines est le même vis-à-vis de l'EDTA. Ceci

démontre que l'extension polyhistidine n'est pas responsable de la fixation du fer dans la protéine. Le spectre UV-visible de la protéine SufA_{STOP} enregistré après incubation avec du fer ferreux puis dessalage est très similaire à celui observé pour SufA_{his}, en absence d'EDTA (figure I-19). Enfin, le spectre Mössbauer obtenu pour la forme SufA_{STOP} chargée en fer est rigoureusement identique à celui de la protéine SufA_{his} (figure I-20), confirmant donc que l'étiquette polyhistidine ne participe pas à la fixation du fer.

Les protéines SufA_{his} et SufA_{STOP} possédant les mêmes propriétés de fixation du fer, toutes les autres expériences ont été réalisées en utilisant uniquement la forme SufA_{his}.

Excès molaires de Fe(II) et d'EDTA par rapport à SufA_{STOP} (monomère) lors de l'incubation	Fer dosé dans SufA_{STOP} après dessalage (fer/monomère de SufA)
4 excès de Fe(II)	1.3
4 excès de Fe(II) + 4 excès d'EDTA	0.1
8 excès de Fe(II)	2.55
8 excès de Fe(II) + 8 excès d'EDTA	0.35

Tableau I-8 : quantité de fer dosée dans SufA_{STOP} après desalage pour différents excès de Fe(II) et d'EDTA lors de l'incubation

II- Etude de la fixation du Fe(III)

Nous avons ensuite étudié la fixation de fer ferrique sur SufA afin de la comparer à celle du Fe(II). Dans ce cas, les expériences sont réalisées en conditions aérobies et le fer est apporté sous forme de chlorure de fer FeCl₃.

II-1- Dosages colorimétriques et spectroscopie UV-visible

La protéine SufA (500 µM) a été traitée avec différents excès de fer ferrique, en présence de DTT (3 mM). Après purification de l'échantillon sur colonne NAP10, la quantité de fer fixée à SufA est déterminée par dosage colorimétrique, selon la méthode de Fish. Comme dans le cas des expériences précédentes (Fe(II), conditions anaérobies), on observe que SufA fixe plusieurs atomes de Fe(III) par monomère. Plus l'excès de FeCl₃ est important

lors de l'incubation, plus la quantité de fer fixée à SufA est importante (tableau I-9). En fait, dans ces conditions, SufA fixe du Fe(III) dans les mêmes proportions que le Fe(II) en conditions anaérobies (voir tableau I-4).

Excès molaires de fer (Fe^{3+}) par rapport à SufA (monomère) lors de l'incubation	Quantité de fer dosée dans SufA après dessalage (fer/monomère)
2	1,1
4	2,2
8	2,9

Tableau I-9: quantité de fer dosée dans SufA_{his} après dessalage pour différents excès de Fe(III) ajouté lors de l'incubation

Les spectres UV-visible, enregistrés pour les protéines SufA chargées en fer obtenues après traitement avec du FeCl_3 puis purification sur NAP10, présentent une bande d'absorption à 320 nm nettement visible ainsi qu'un épaulement à 500 nm mal défini (figure I-29). La bande d'absorption à 320 nm a été associée, par Johnson et coll., à une bande de transfert de charge $\text{N} \rightarrow \text{Fe(III)}$ (Clay *et al.*, 2002). En revanche, dans le cas de IscA chargée en fer, elle a été rapportée comme étant caractéristique de la présence de fer fixé de façon spécifique à la protéine, au niveau de résidus cystéines (Ding and Clark, 2004).

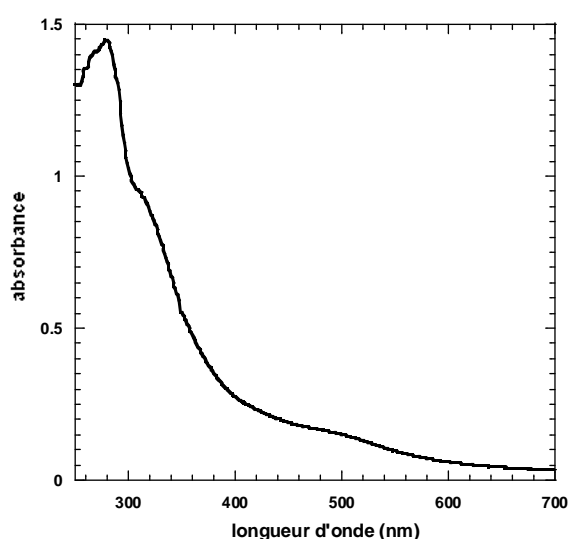


Figure I-29 : spectre UV-visible de SufA_{his} (85 μM , 2,2 fer/monomère) après incubation avec 4 excès molaires de Fe(III) et purification sur NAP10.

II-2- Spectroscopie Mössbauer

Nous avons ensuite caractérisé la fixation du fer ferrique au sein de SufA par spectroscopie Mössbauer. Cette étude, je le rappelle, nous permet de déterminer l'environnement du fer ferrique fixé à SufA, et de savoir si les atomes de Fe(III) sont localisés ou non au niveau du « site actif » de la protéine (les cystéines conservées). Ainsi, nous avons analysé une forme de SufA traitée avec 4 excès de $^{57}\text{FeCl}_3$, en absence d'EDTA, et purifiée sur colonne NAP10. Cette forme contient 1,5 atomes de fer par monomère.

Le spectre (figure I-30), enregistré à 105 K, est complexe ; il est composé d'un sextet (A) et d'un doublet (B), représentant 85 % et 15 % du fer total respectivement.

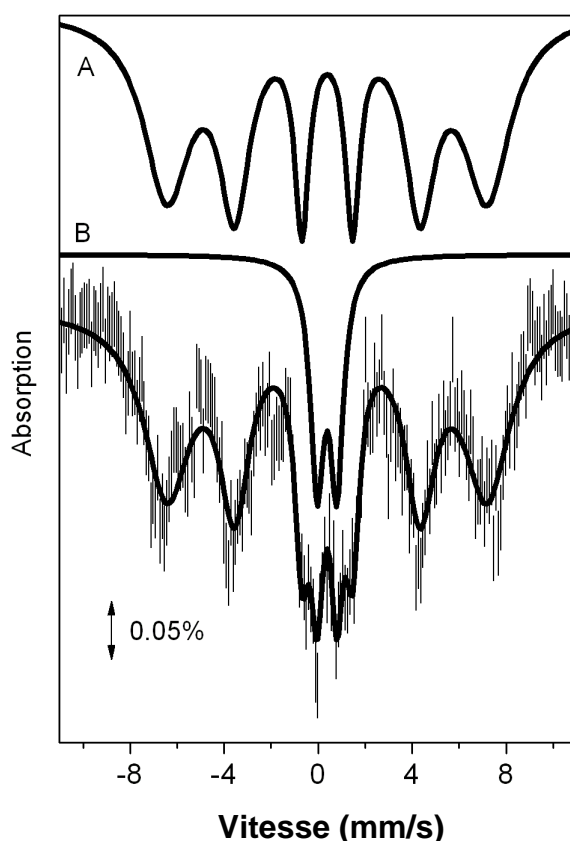


Figure I-30 : spectre Mössbauer la forme SufA- $^{57}\text{Fe(III)}$ (660 μM , 1,5 fer/monomère) enregistré à 105 K. Les paramètres du doublet et du sextet constituant le spectre Mössbauer sont indiqués dans le texte.

Les paramètres correspondants ($\delta_A = 0,38 \text{ mm/s}$, $2\varepsilon = -0,08 \text{ mm/s}$ pour le sextet A et $\delta_B = 0,38 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,84 \text{ mm/s}$ pour le doublet B) sont cohérents avec du Fe(III) haut spin dans un environnement octaédrique, coordonné par des atomes d'azote ou d'oxygène. Toutefois, la valeur du déplacement isomérique δ (δ_A et δ_B) est un peu plus faible que celle

caractérisant des ions Fe^{3+} coordonnés par des atomes d'azote et d'oxygène. Ceci peut suggérer que d'autres ligands, tels que le soufre, interviennent, mais alors de façon minoritaire.

Finalement, on peut conclure que les atomes de Fe(III) sont coordonnés majoritairement par des atomes d'azote et d'oxygène, et ne se trouvent donc pas, de façon générale, localisés au niveau du site actif de la protéine.

II-3- Effet de l'EDTA

Afin de mieux caractériser la fixation du Fe(III) sur SufA, nous avons étudié l'influence de l'EDTA lors de l'incubation de la protéine avec le chlorure de fer. Comme le montre la figure I-31, l'ajout de 1 ou 2 équivalents d'EDTA par rapport au fer ne suffit pas à obtenir une forme quasiment apo de la protéine. Il reste plus d'un atome de fer dans SufA après traitement avec 2 équivalents d'EDTA par rapport au fer. Pour comparaison, je rappelle qu'après traitement avec 4 excès de Fe(II) et 4 excès d'EDTA en conditions anaérobies, SufA contient 0,28 atome de fer par monomère. Ceci révèle que les atomes de Fe(III) au sein de SufA ne sont pas aussi facilement chélatables que le sont les atomes de Fe(II) (voir paragraphe I-2). Ils semblent être plus fortement fixés à la protéine SufA.

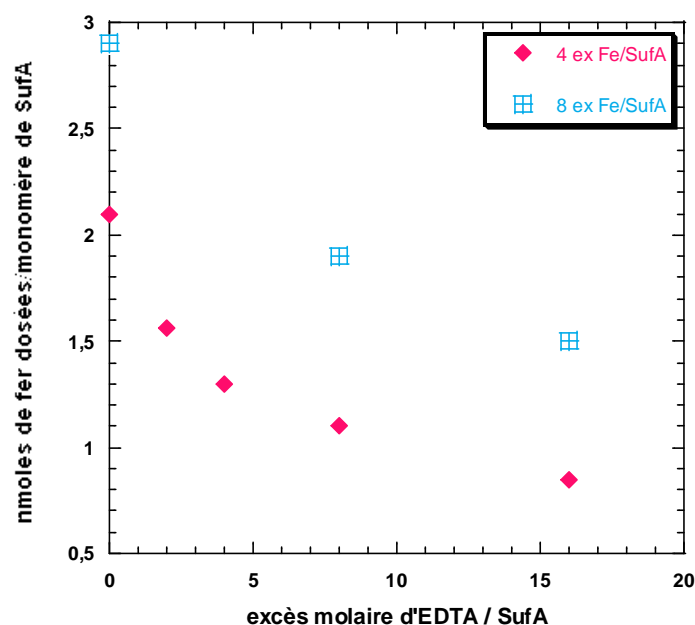


Figure I-31 : quantité de fer dosée dans SufA_{his} après dessalage en fonction de l'excès molaire d'EDTA ajouté par rapport à SufA.

II-4- Calcul de la constante d'association de SufA_{his} pour le Fe(III)

Afin de quantifier l'interaction de SufA pour le Fe(III), nous avons déterminé la constante d'association de SufA pour le Fe(III). Pour cela, nous avons suivi la même démarche que celle décrite dans le cas du Fe(II) (voir paragraphe I-3). Nous avons donc également réalisé des réactions de compétition entre la protéine SufA et le citrate de sodium, vis-à-vis du Fe(III), et déterminé la quantité de Fe(III) restant dans la protéine pour différents excès de citrate de sodium ajouté. La valeur de la constante d'association du citrate de sodium avec le Fe(III), utilisée pour nos calculs, est $\beta_{\text{Fe(III)L}} = 10^{12,4} \text{ M}^{-1}$ (Silen and Martel, 1964). Cette valeur tient compte du fait qu'au pH de travail (pH = 8), le citrate de sodium n'est pas totalement déprotoné et existe majoritairement sous forme LH.

Après calcul, nous avons pu déterminer que $\beta_{\text{Fe(III)P}} = 2.10^{14} \text{ M}^{-1}$. Cette valeur montre que SufA fixe les atomes de Fe^{3+} assez fortement. Pour comparaison, on peut noter que dans le cas de la transferrine, dont la fonction reconnue est le stockage et le transport du fer, la constante d'association avec le Fe est de 10^{20} M^{-1} (Aisen *et al.*, 1978).

III- Dosages de fer dans IscA et comparaison avec SufA

Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction bibliographique, plusieurs études concernant la fixation du fer sur IscA d'*E. coli* ont été réalisées et publiées durant ma thèse par Ding et coll. Elles montrent que IscA fixe au maximum 0,5 atome de fer par chaîne polypeptidique, et ce uniquement en milieu réducteur (présence de DTT ou du système thioredoxine/thioredoxine réductase) (Ding and Clark, 2004; Ding *et al.*, 2005b). De plus, ces atomes de fer sont mobilisables pour l'assemblage de centres [Fe-S] au sein de IscU (Ding *et al.*, 2005a; Ding *et al.*, 2004). Afin de comparer les propriétés de fixation du fer des deux protéines homologues SufA et IscA, nous avons répété les expériences décrites précédemment pour SufA, en utilisant cette fois-ci la protéine IscA d'*E.coli*.

III-1- Etude de la fixation du Fe(II) sur IscA en conditions anaérobies

Tout d'abord, IscA (500 μM) a été traitée avec différents excès de Fe(II) et d'EDTA en présence de DTT (3 mM), pendant 30 minutes, en conditions anaérobies, comme cela a été

détaillé pour SufA. La quantité de fer dans la protéine a alors été dosée après purification de l'échantillon sur colonne NAP10. Il apparaît que IscA est capable de fixer plusieurs atomes de fer par monomère et que plus l'excès de fer est important lors de l'incubation, plus la quantité de fer fixée à IscA est importante, et ce de façon identique à SufA (figure I-32). D'autre part, l'ajout d'un équivalent d'EDTA par rapport au fer suffit à chélater la grande majorité du fer fixé à la protéine, celle-ci contenant alors moins de 0,2 atome de fer par monomère. Ceci montre que le Fe(II) est également faiblement lié à la protéine IscA. Ainsi, le comportement des deux protéines IscA et SufA d'*E. coli*, vis-à-vis du Fe(II), dans des conditions anaérobies, est assez similaire.

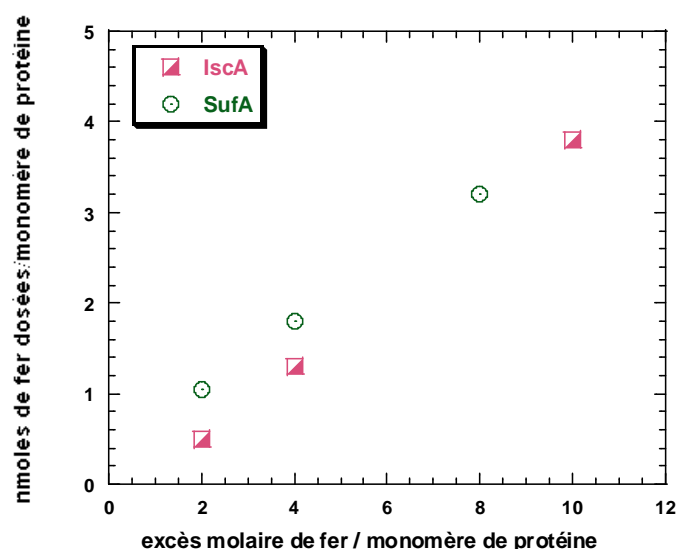


Figure I-32 : quantité de fer dosée dans IscA_{his} et SufA_{his} après traitement avec différents excès de fer puis dessalage, en conditions anaérobies.

Le spectre UV-visible obtenu pour la protéine IscA chargée en fer, après traitement avec un excès de Fe(II) et purification sur NAP10 (figure I-33) présente une bande d'absorption à 320 nm ; les épaulements à 430 nm et 500 nm observés dans le cas de SufA-Fe (voir figure I-19) ne sont pas clairement définis : on a une absorption large centrée autour de 450 nm.

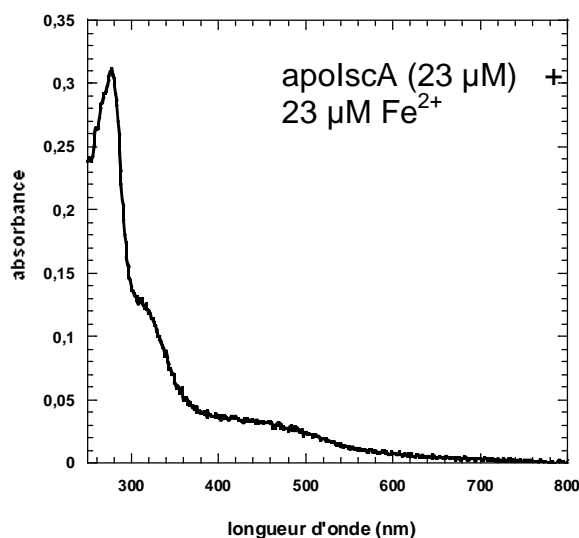


Figure I-33 : spectre UV-visible de IscA (23 µM) après incubation avec 1 excès molaire de Fe(II) et dessalage en conditions anaérobies

III-2- Expériences en conditions aérobies

Les résultats obtenus tendent à montrer que IscA, selon notre protocole expérimental, et en conditions anaérobies, possède les mêmes caractéristiques que SufA vis-à-vis de la fixation du Fe(II). Cependant, nos résultats ne sont pas comparables avec ceux rapportés par Ding et coll. (Ding and Clark, 2004), les conditions expérimentales n'étant pas les mêmes dans les deux cas. En effet, Ding et coll. effectue le traitement de IscA avec du Fe(II) (jusqu'à 4 excès molaires) i) en conditions aérobies ; ii) le temps d'incubation de la protéine avec le Fe(II) est de 5 minutes seulement ; iii) ils introduisent un excès important de DTT (40 excès molaires par rapport à IscA, contre 6 excès dans notre cas) dans le milieu réactionnel. Afin de compléter notre étude, nous avons alors réalisé de nouvelles expériences en reproduisant exactement les conditions expérimentales décrites par Ding et coll (Ding and Clark, 2004). Nous avons également étudié l'influence du temps d'incubation de IscA avec le fer en répétant les expériences en augmentant le temps d'incubation de 5 minutes à 30 minutes. Les résultats sont présentés tableau I-10 et figure I-34.

Tout d'abord, il semble que la protéine conserve un comportement similaire à celui décrit en conditions anaérobies : la quantité de fer dans IscA augmente avec l'excès de fer durant l'incubation ; on n'observe donc pas de saturation au niveau de la fixation du fer, comme cela a été montré par Ding et coll. (Ding and Clark, 2004) (figure I-34 b).

Conditions d'incubation	Quantité de fer dosée dans IscA
2 excès de fer par rapport à IscA (monomère)	0,42 atome de fer/monomère
4 excès de fer par rapport à IscA	0,7 atome de fer/monomère
10 excès de fer par rapport à IscA	1,8 atome de fer/monomère

Tableau I-10 : quantité de fer dosée dans IscA après incubation avec différents excès de fer pendant 5 minutes et dessalage.

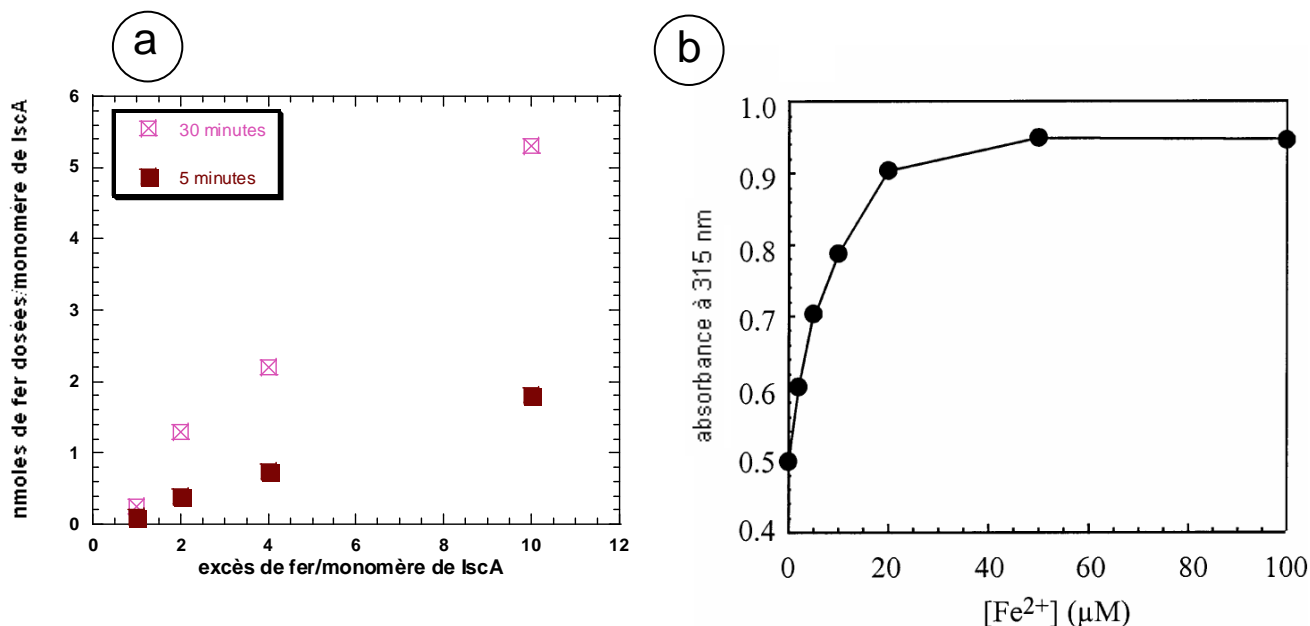


Figure I-34 : (a) quantité de fer dosée dans IscA après traitement avec différents excès de Fe(II) pendant 5 ou 30 minutes en conditions aérobies puis dessalage ; (b) courbe de saturation obtenue par Ding et coll. lors du traitement de IscA (50 μM) avec différents excès de Fe(II) pendant 5 minutes en conditions aérobies (saturation à 0,95 fer/dimère de IscA) (Ding and Clark, 2004)

D'autre part, on observe que le temps d'incubation de la protéine avec le fer a une influence sur la fixation du fer au sein de IscA : en effet, les quantités de fer dosées dans IscA sont plus faibles après 5 minutes qu'après 30 minutes d'incubation (figure I-34 a). Il faut noter qu'après 30 minutes d'incubation, ce qui correspond aux conditions expérimentales

utilisées pour les études sur la protéine SufA, les quantités de fer dosées dans IscA sont similaires à celles obtenues pour SufA.

En conclusion, nous n'avons pas pu reproduire les résultats décrits par Ding et coll., IscA étant capable, dans nos mains, de fixer plus de 0,5 atomes de fer par monomère.

Discussion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les propriétés de la protéine SufA vis-à-vis de la fixation du fer. Cette problématique a été abordée par différents groupes de recherche dans le cas de protéines « scaffold » de type U. Les résultats obtenus sont sujets à controverse. En effet, Cowan et coll. ont montré, par spectroscopie de fluorescence, que IscU de *T. maritima* présente une forte affinité pour le fer ($K_d = 0,3 \mu\text{M}$ pour le Fe(III) et $K_d = 2,7 \mu\text{M}$ pour le Fe(II)) (Nuth *et al.*, 2002). En revanche, Johnson et coll. ont observé, en utilisant des techniques biochimiques et spectroscopiques, que IscU d'*A. vinelandii* ne fixait pas de fer, quel que soit son degré d'oxydation (Smith *et al.*, 2001). Il semble donc qu'il existe de grandes différences entre les protéines « scaffold » quant à leurs propriétés vis-à-vis de la fixation du fer. Nous n'avons aucune explication pour tenter de comprendre ces différences, si ce n'est le fait que ces protéines appartiennent à des organismes différents.

Dans notre cas, nous avons pris comme modèle d'étude la protéine SufA d'*E. coli*. Nous avons pu montrer, par des techniques biochimiques, que SufA est capable de fixer du fer ferrique et ferreux. Dans les deux cas, la quantité de fer fixée à la protéine augmente avec l'excès de fer présent lors de l'incubation. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de phénomène de saturation. Ceci suggère que, dans nos conditions expérimentales, la fixation du fer sur SufA est non spécifique.

D'autre part, nous avons réalisé plusieurs expériences, en utilisant différentes techniques (biochimique : dosages colorimétriques, et spectroscopique : Mössbauer) afin de déterminer les sites de fixation du fer au sein de SufA. Les analyses nous ont amené à conclure que le Fe fixé dans SufA est très majoritairement coordonné par des atomes d'azote et d'oxygène (environ 80 % dans le cas de Fe(II) et quasiment 100 % dans le cas du Fe(III)). Il est possible que les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} fixés sur SufA soient localisés aux mêmes sites de

coordination. En conclusion, les atomes de fer, quelque soit leur degré d'oxydation, ne se trouvent pas au niveau des cystéines conservées, définies comme le site actif de la protéine, ou alors très marginalement. Ils se trouvent dans un environnement constitué de ligands azotés et oxygénés. On peut alors s'interroger sur la localisation précise du fer au sein de SufA. Existe-t-il un ou plusieurs site(s) de fixation spécifique(s) du fer ? Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la structure cristallographique de apoSufA d'*E. coli* révèle qu'un résidu, le glutamate 118, est proche des cystéines C-terminales (Wada *et al.*, 2005). Même si ce résidu n'est pas strictement conservé parmi les espèces, on peut envisager qu'il ait une bonne affinité pour le fer et soit, ou fasse partie, des ligands coordonnant le fer au sein de SufA d'*E. coli*. Il pourrait donc être intéressant de muter cet acide aminé et d'étudier les capacités de la protéine ainsi modifiée à fixer du fer.

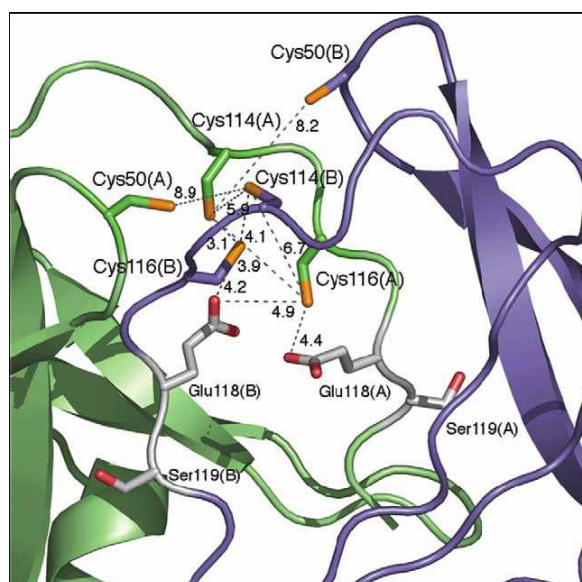


Figure I-35 : structure cristallographique de SufA d'*E. coli* montrant la position du glutamate 118 par rapport aux cystéines C-terminales (Wada *et al.*, 2005)

Nous avons également cherché à mesurer l'interaction du fer avec SufA. Sur ce point, nous avons observé une différence marquée entre le fer ferrique et le fer ferreux. En effet, nous avons tout d'abord remarqué que les atomes de Fe(II) fixés sur SufA, après traitement de la protéine avec du Fe(II) introduit sous forme de sel de Mohr en conditions anaérobies, sont facilement chélatables puisque l'ajout d'un équivalent d'EDTA par rapport au fer conduit à l'obtention d'une protéine SufA quasiment dépourvue de fer (moins de 0,3 atome de fer par monomère pour une protéine traitée avec 4 excès de Fe(II) et 4 excès d'EDTA). L'étude de réactions de compétition entre SufA et des chélateurs vis-à-vis du fer nous a ensuite permis d'établir que la constante d'association de SufA pour le Fe(II) est de l'ordre de 10^5 M^{-1} . Cette

valeur est de l'ordre de grandeur de celles rapportées dans le cas de la protéine Fur ($K_{\text{ass}} = 5.10^4 \text{ M}^{-1}$) (Mills and Marletta, 2005) et de la protéine CyaY ($K_{\text{ass}} = 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Bou-Abdallah *et al.*, 2004). Elle est assez faible et montre donc que le Fe(II) est faiblement fixé à toutes ces protéines (CyaY, Fur et SufA. Dans le cas des protéines Fur et CyaY, il n'en demeure pas moins que la fixation du Fe(II) sur ces deux protéines est hautement significative d'un point de vue biologique. Lorsque le fer est apporté sous forme ferrique, les atomes de fer (Fe^{3+}) sont plus fortement fixés à la protéine SufA. L'ajout de 2 équivalents d'EDTA par rapport au fer ne suffit pas à obtenir une forme de SufA quasiment dépourvue de fer : il reste encore au minimum un atome de fer dans SufA. Nous avons quantifié l'interaction du fer ferrique avec SufA en calculant la constante d'association de SufA avec le Fe(III). Celle-ci a été établie à 2.10^{14} M^{-1} . Pour comparaison, on peut noter que la constante d'association de la transferrine, connue comme étant un transporteur de fer, avec le fer, est de 10^{20} M^{-1} (Aisen *et al.*, 1978). De même, la constante d'association de IscA avec le fer (Fe(III)) a été déterminée par Ding et coll. à 10^{19} M^{-1} (Ding and Clark, 2004). Tout ceci montre que SufA est capable de fixer du Fe(III) assez fortement, de façon similaire à IscA.

Finalement, l'ensemble des résultats obtenus, c'est-à-dire le fait que SufA puisse accumuler du Fe(II), que les atomes de Fe(II) soient faiblement liés à la protéine et qu'ils ne se trouvent pas au niveau du site actif, nous conduit à penser que le fer ferreux est fixé de façon « non spécifique » sur la protéine SufA d'*E. coli*. En revanche, SufA est capable de fixer du fer ferrique assez fortement. Toutefois, il faut noter que les atomes de Fe(III) ne se trouvent pas non plus au niveau des cystéines conservées de SufA.

Pour revenir à la protéine IscA, de nombreuses études concernant la fixation de fer sur cette protéine ont été réalisées et publiées par Ding et coll. Elles montrent que IscA d'*E. coli* est capable de fixer jusqu'à 0,5 atome de fer par chaîne polypeptidique après incubation avec du Fe(II) en conditions aérobies (Ding and Clark, 2004). Cette fixation ne se produit qu'en présence d'un réducteur, DTT ou système thiorédoxine/thiorédoxine réductase (Ding and Clark, 2004; Ding *et al.*, 2005b). Ding et coll. ont également montré, en déterminant la constante d'association de IscA avec le fer ($K = 10^{19} \text{ M}^{-1}$) que le fer est fortement lié à la protéine (Ding and Clark, 2004). Nous avons donc observé que les protéines SufA et IscA d'*E. coli* avaient des constantes d'association avec le Fe(III) du même ordre de grandeur (SufA : 10^{14} M^{-1} , IscA : 10^{19} M^{-1}).

En revanche, je rappelle que nous avons montré que la quantité de fer fixé dans SufA augmente avec l'excès de fer lors de l'incubation. Dans nos mains, quelles que soient les

conditions expérimentales utilisées (celles mises au point pour SufA (apport de Fe(II) en conditions anaérobies) ou celles décrites par Ding et coll.(apport de Fe(II) en conditions aérobies)), nous n'avons pas observé non plus d'effet de saturation pour la fixation du fer sur IscA (voir figure I-34 a et b), celle-ci pouvant fixer plus de 0,5 atome de fer par monomère. Les deux protéines SufA et IscA ont, dans nos mains, un comportement similaire. Nous n'avons pas d'explications à ce jour pour comprendre de telles différences entre les deux laboratoires.

D'après les résultats publiés par Ding et coll., il existe une autre différence majeure entre IscA et SufA. En effet, ces auteurs proposent, en se basant sur des analyses de spectroscopie UV-visible réalisées sur la protéine sauvage et les mutants Cys→Ser, que le fer est localisé, dans IscA, au niveau des cystéines conservées. En effet, le spectre UV-visible publié de la forme IscA-Fe présente une bande d'absorption intense à 320 nm. Après mutation de l'une des deux cystéines C-terminales, le spectre UV-visible de la protéine traitée avec du fer ne comporte plus cette bande d'absorption à 320 nm, suggérant que IscA ne fixe plus de fer et donc que les cystéines conservées Cys99 et Cys101 de IscA d'*E. coli* sont les sites de fixation du fer. Finalement, par comparaison des différents spectres UV-visible, Ding et coll. ont attribué la bande d'absorption à 320 nm à du fer fixé de façon spécifique à la protéine au niveau de résidus cystéines (Ding and Clark, 2004). Toutefois, il faut noter que cette bande a précédemment été rapportée, par une autre équipe, comme étant une bande de transfert de charge N→Fe(III) (Clay MD, 2002). Dans le cas de SufA, les analyses de spectroscopie Mössbauer, qui est une technique spectroscopique très informative, ont montré que le fer est coordonné majoritairement par des atomes d'azote et d'oxygène. Il est donc dommage qu'aucune analyse par spectroscopie Mössbauer n'ait été réalisée sur IscA, afin de mieux caractériser l'environnement du fer présent au sein de la protéine. En conclusion, les résultats rapportés par Ding et coll. sont différents de ceux qui ont été observés, dans notre cas, avec la protéine SufA, en ce qui concerne la nature des ligands du fer, puisque nous avons montré de façon non ambiguë que les cystéines conservées fixent préférentiellement le soufre.

Partie I

Chapitre IV

Etude de la formation du cluster [Fe-S] dans SufA

Introduction

Aujourd'hui, la plupart des protéines constituant les machineries de biosynthèse des centres [Fe-S] chez la bactérie ont été caractérisées. Un des objectifs majeurs est donc maintenant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'assemblage des centres [Fe-S] au sein des protéines scaffold. Cette problématique a déjà été abordée ces dernières années par différents groupes de recherche, qui ont essayé de déterminer les intermédiaires clé sur IscU dans ce processus (Nuth *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2001).

En prenant comme modèle d'étude la protéine SufA d'*E. coli*, nous nous sommes intéressés à cette question, en cherchant à savoir si les formes intermédiaires étudiées précédemment (formes chargées en soufre ou en fer (Fe^{2+})) étaient réactives pour former un centre [Fe-S] après ajout de l'élément manquant. Cette étude a essentiellement été réalisée par spectroscopie UV-visible et Mössbauer.

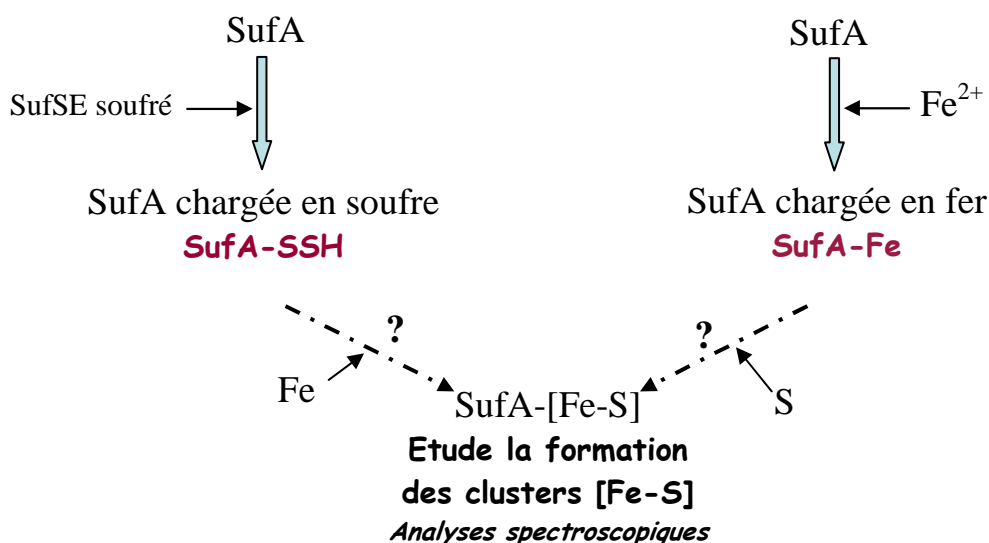


Figure I-36 : démarche adoptée pour l'étude de la formation des centres [Fe-S] dans SufA

I- Formation du centre [Fe-S] à partir de chacune des deux formes intermédiaires

I-1- Formation du centre [Fe-S] à partir de SufA-SSH après ajout de fer

I-1-1- Source de fer : sel de Mohr

L'ensemble des expériences est réalisé en conditions anaérobies ($O_2 < 4$ ppm), à 18°C.

Tout d'abord, nous avons préparé la forme chargée en soufre, SufA-SSH, comme décrit dans le chapitre II, en traitant la protéine avec des quantités catalytiques de SufSE et un excès de L-cystéine substrat. Après purification de l'échantillon sur colonne NAP10, une analyse par spectrométrie de masse nous a permis de vérifier que la fixation du soufre sur la protéine était correcte avec 1,45 atomes de soufre par monomère. Un léger excès de $^{57}Fe(II)$ (3 excès molaires par rapport à SufA) est ensuite ajouté. Après un temps d'incubation variable (de 10 minutes à une nuit) à 18°C, l'échantillon a été analysé par différentes techniques spectroscopiques. Le spectre UV-visible de l'échantillon après 1 heure d'incubation (figure I-37a) contient uniquement une bande d'absorption à 280 nm due à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. Aucune bande d'absorption entre 300 nm et 500 nm pouvant indiquer la présence d'un centre [Fe-S] dans la protéine n'apparaît. Le léger épaulement perçu vers 420 nm est dû à l'absorption du PLP de SufS, présente en faible quantité dans l'échantillon pour l'obtention de la forme soufrée de SufA. Le spectre Mössbauer du même échantillon (figure I-37b) est composé d'un seul doublet, dont les paramètres ($\delta = 1,17$ mm/s et $\Delta E_Q = 3,02$ mm/s) sont caractéristiques de Fe(II) coordonné par des atomes d'azote et d'oxygène, dans un environnement octaédrique. Aucun doublet pouvant indiquer la présence d'un centre [Fe-S] n'est observé. Un spectre identique a été obtenu dans le cas du mutant SufA_{C50S} préalablement chargé en soufre et traité avec du Fe(II). Finalement, ces résultats indiquent que le fer introduit sur la forme SufA-SSH ne réagit pas avec les atomes de soufre présents au niveau du site actif, pour former un cluster [Fe-S].

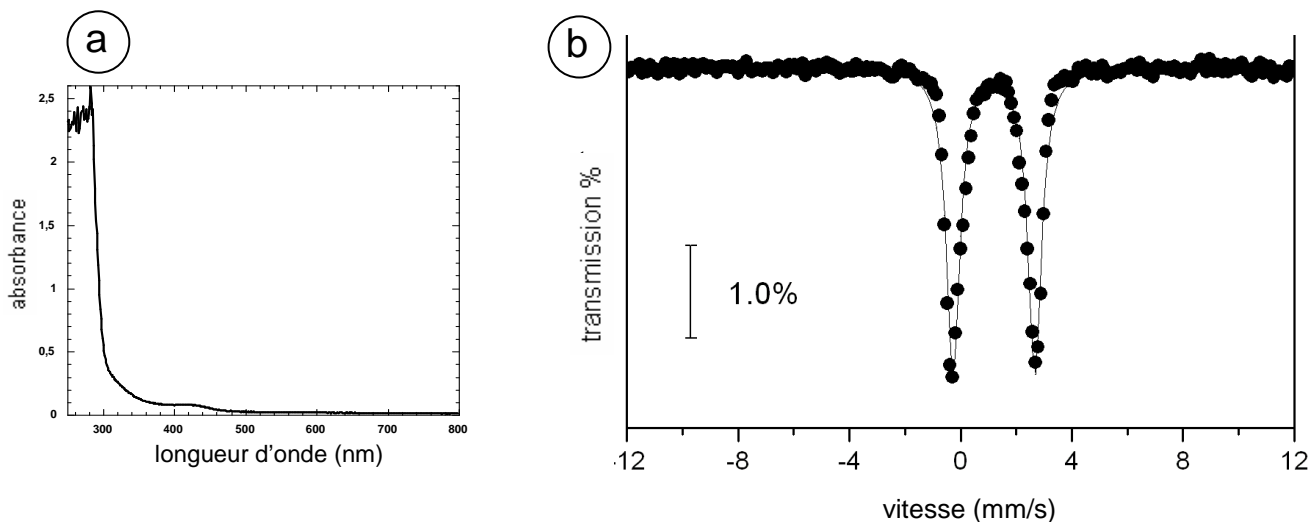


Figure I-37 : analyses spectroscopiques de SufA-SSH après incubation avec 3 excès molaires de $^{57}\text{Fe(II)}$ pendant 1 heure. (a) spectre UV-visible, SufA (100 μM) ; (b) spectre Mössbauer enregistré à 4,2 K, SufA (430 μM , 1,3 mM de fer).

Afin de mieux comprendre l'absence de réaction et de vérifier que le fer peut se fixer à la protéine SufA-SSH pour conduire à la formation d'un centre [Fe-S], nous avons dosé le fer fixé à la protéine après purification, sur colonne NAP10, de l'échantillon analysé précédemment par spectroscopie Mössbauer. La protéine contient 1,4 atomes de fer par monomère (pour 3 excès de Fe(II) introduit lors de l'incubation). Ceci montre que la forme SufA-SSH fixe du Fe(II) dans les mêmes proportions que la protéine SufA apo. Ce résultat, ainsi que les analyses de spectroscopie Mössbauer, montrant que les atomes de Fe(II) sont coordonnés exclusivement par des atomes d'azote et d'oxygène tendent à montrer que les protéines SufA-SSH et SufA apo ont des comportements similaires vis-à-vis de la fixation du Fe(II), et que les atomes de Fe^{2+} sont localisés aux mêmes sites de coordination dans les deux cas. Tout ceci semble indiquer que SufA est capable de fixer du fer et du soufre, en des sites distincts, sans que ces éléments ne réagissent entre eux pour conduire à la formation d'un centre [Fe-S].

Nous venons de montrer qu'aucune réaction ne se produit lors de l'ajout de Fe(II) sur la forme SufA-SSH. Nous nous sommes alors demandés si ce manque de réactivité n'était pas dû soit à l'absence des autres protéines de l'opéron dans le milieu réactionnel, le complexe SufBCD par exemple, soit à l'utilisation d'une source de fer chimique et non physiologique. Nous avons alors essayé d'autres conditions, explicitées dans les deux paragraphes suivants.

I-1-2- Influence du complexe SufBCD sur l'étape de formation du centre [Fe-S] à partir de la forme SufA-SSH.

La même expérience (que celle décrite dans le paragraphe précédent) a été effectuée en présence du complexe SufBCD (ajouté en quantité équimolaire par rapport à SufSE, soit 6 μM), et d'un excès d'ATP (2 mM) et de Mg^{2+} (4 mM). Après 2 à 3 heures d'incubation, le spectre UV-visible de la protéine SufA est identique à celui présenté ci-dessus (figure I-37a). Par conséquent, le complexe SufBCD n'a aucune influence, dans les conditions expérimentales utilisées, sur l'étape de formation du cluster au sein de la protéine SufA, après ajout de Fe(II) sur la forme SufA-SSH.

I-1-3- Apport du fer par CyaY

Comme cela a déjà été mentionné en introduction, des études menées au laboratoire durant ma thèse ont montré que la protéine CyaY était capable de fixer plusieurs atomes de fer, sous forme ferrique, et que ces atomes pouvaient être mobilisés pour la formation de centres [Fe-S] au sein de IscU, en présence de la cystéine désulfurase IscS et de cystéine substrat (Layer *et al.*, 2006). Nous avons donc décidé d'étudier la formation des centres [Fe-S] à partir de la forme SufA-SSH en prenant la protéine CyaY comme source de fer.

Nous n'avons pas observé de résultats concluants : l'apport de fer sous forme physiologique, par l'intermédiaire de CyaY, ne permet pas non plus la formation de centres [Fe-S] dans SufA.

I-2- Formation du centre [Fe-S] à partir de SufA-Fe après ajout de soufre

Nous avons également envisagé la formation des centres [Fe-S] au sein de SufA à partir de la deuxième forme intermédiaire étudiée, la forme SufA-Fe, après un apport de soufre sous forme physiologique, par l'intermédiaire du complexe SufSE. En effet, bien que l'on ait montré que les atomes de Fe(II) sont faiblement liés à la protéine et qu'ils ne se trouvent pas au niveau du site actif mais plutôt coordonnés par des atomes d'azote et d'oxygène, il n'est pas exclu que ces atomes soient mobilisables et réactifs pour la formation de centres [Fe-S] au sein de la protéine.

La forme SufA-Fe, contenant 1,8 atomes de fer par monomère, a été incubée avec des quantités stoechiométriques du complexe SufSE préalablement chargé en soufre (4 atomes de soufre par complexe, soit 4 excès de soufre par rapport à SufA). Nous avons testé différents temps d'incubation (de 10 minutes à 1 nuit) ; nous n'avons pas réussi à observer la formation de centres [Fe-S] au sein de SufA. Les spectres Mössbauer obtenus sont similaires à ceux enregistrés pour la forme SufA-Fe (voir chapitre III), démontrant que, dans ces conditions, les atomes de soufre apportés par le donneur physiologique, SufSE, ne réagissent pas avec les atomes de fer déjà fixés sur SufA. Une analyse complémentaire par spectrométrie de masse nous a permis de vérifier que la forme SufA-Fe fixe du soufre après incubation avec le complexe SufSE. De fait, les spectres de masse obtenus sont identiques à ceux enregistrés pour la protéine apo SufA traitée avec le complexe SufSE dans les mêmes conditions : ils comportent des pics additionnels indiquant la fixation de plusieurs atomes de soufre (jusqu'à 3 atomes de soufre). Ces analyses démontrent que les atomes de fer présents au sein de SufA (forme SufA-Fe) n'empêchent pas la fixation du soufre par les cystéines conservées de la protéine, ce qui par ailleurs confirme l'idée que les atomes de Fe(II) ne sont pas localisés au niveau des résidus cystéines de SufA (voir conclusion chapitre III). D'autre part, ces résultats nous montrent que l'on se trouve dans une situation identique à celle décrite dans le paragraphe I-1 (c'est-à-dire obtenue après traitement de la forme SufA-SSH avec du Fe(II)) : la protéine SufA contient à la fois du fer et du soufre, en des sites distincts (le soufre étant coordiné par les cystéines conservées et le fer majoritairement par des atomes d'azote et d'oxygène), sans que ces éléments ne réagissent entre eux pour conduire à la formation d'un centre [Fe-S].

I-3- Réactivité des persulfures/polysulfures sur SufA-SSH vis-à-vis des agents alkylants

Les résultats obtenus jusqu'à présent tendent à montrer que les atomes de soufre fixés sur SufA ne sont pas réactifs vis-à-vis du fer(II) pour former un centre [Fe-S]. Nous avons donc cherché à mieux caractériser ces entités persulfures/polysulfures présentes sur SufA afin de comprendre l'absence de réaction.

Les groupements thiolates ($R-S^-$) sont connus pour être de bons nucléophiles, capables de réagir avec des agents alkylants. Nous avons d'ailleurs constaté que les cystéines de SufA pouvaient réagir avec l'iodoacétamide (voir chapitre III). Nous avons voulu vérifier que cette caractéristique s'appliquait aux entités persulfures/polysulfures formées sur la protéine SufA.

Nous avons tout d'abord travaillé avec la protéine CsdE, prise comme modèle d'étude. CsdE d'*E.coli* ne contient qu'un seul résidu cystéine dans sa séquence, sur lequel plusieurs (deux) atomes de soufre peuvent s'assembler sous forme de persulfure/polysulfure après réaction de transpersulfuration avec CsdA (Loiseau *et al.*, 2005). Après avoir obtenu la forme soufrée de CsdE débarrassée de cystéine, celle-ci a été traitée avec 25 excès d'iodoacétamide pendant 3 heures dans l'obscurité. L'échantillon purifié sur colonne Micro Bio-spin a été analysé par spectrométrie de masse. Les spectres de masse enregistrés avant et après traitement à l'iodoacétamide ont été comparés (figure I-38 a et b).

Le spectre de CsdE chargée en soufre (figure I-38a) contient, en plus du pic correspondant à la forme apo de la protéine ($M_{\text{CsdE}} = 16875$ Da), deux pics additionnels indiquant la fixation de un et deux atomes de soufre ($M = M_{\text{CsdE}} + nx32$ Da, $n = 1$ ou 2), comme décrit dans la littérature (Loiseau *et al.*, 2005). Après incubation avec l'iodoacétamide (figure I-38b), ces pics disparaissent au profit de deux nouveaux pics correspondant à l'addition d'une entité acétamide sur chacune des formes soufrées de CsdE.

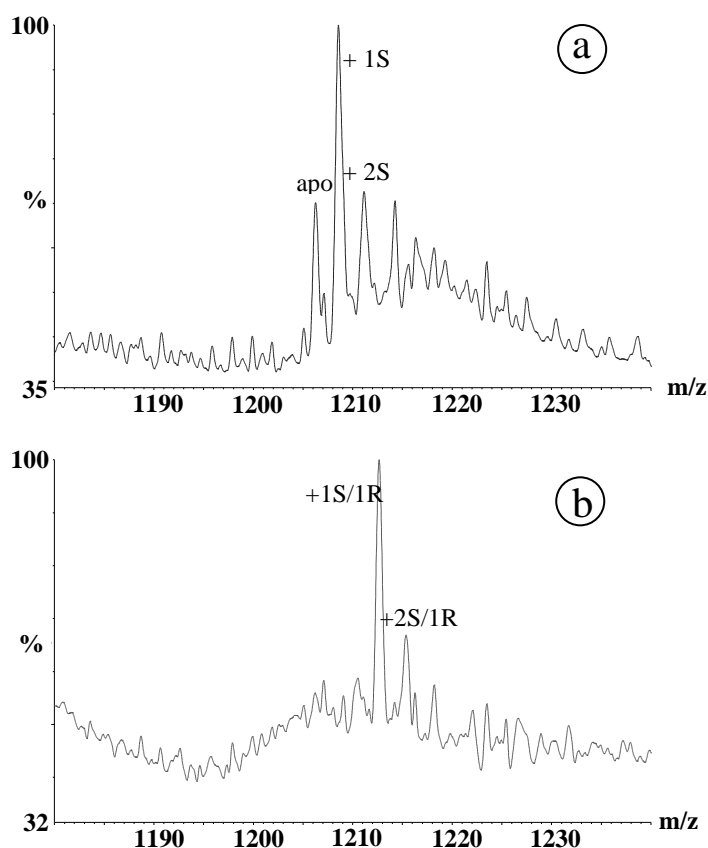
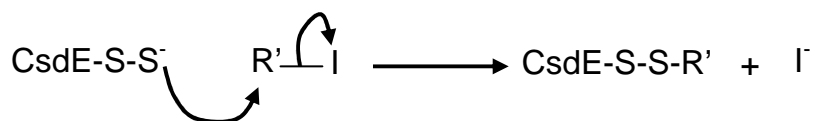


Figure I-38 : spectre de masse de CsdE (500 nM) après incubation avec 1 équivalent de CsdA et un fort excès de L-cystéine et dessalage (a), puis traitée avec 25 excès molaires d'iodoacétamide et dessalage (b) (R = acétamide ; S = soufre). Seul l'état de charge $z = 10$ est représenté.

Cette expérience montre bien que les persulfures/polysulfures de CsdE fixés sur une seule cystéine, et donc présents sous forme linéaire, sont nucléophiles et peuvent réagir avec des agents alkylants, selon la réaction suivante :



Le même type d'expérience a été répété avec les protéines SufA, sauvage et mutantes. Dans ce cas, les spectres obtenus sont complexes ; nous n'avons donc pas pu présenter un spectre reconstruit de la protéine. C'est pourquoi la figure I-39 correspond à un seul état de charge ($z=11$).

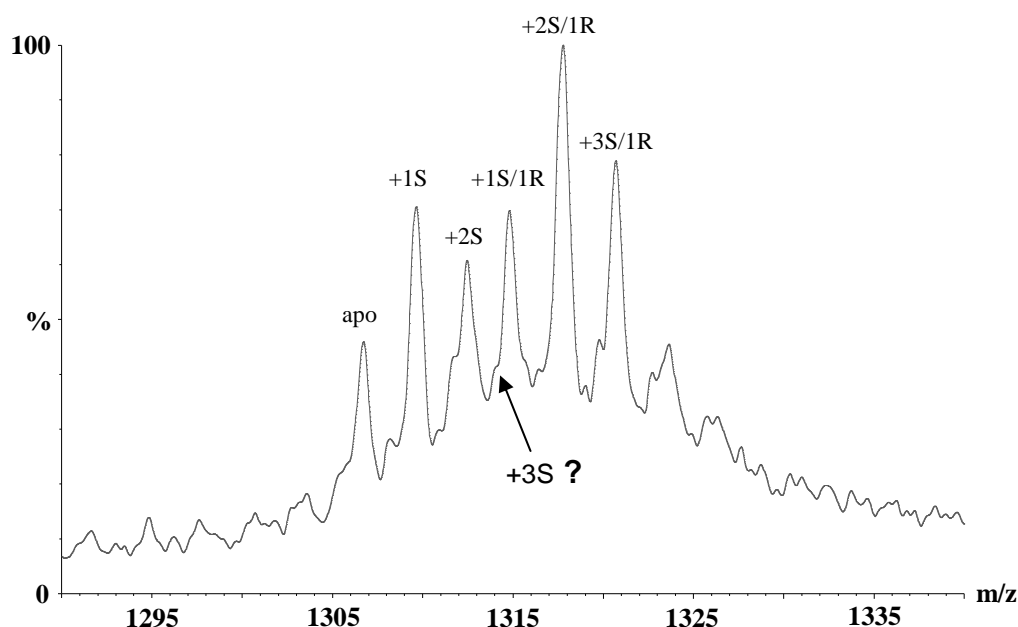


Figure I-39 : spectre de masse de SufA (500 nM) après transfert de soufre depuis le complexe SufSE et traitement avec 25 excès molaire d'iodoacétamide à température ambiante puis dessalage (S= atome de soufre ; R = groupement acétamide). Seul l'état de charge $z=11$ est représenté.

Le spectre de masse enregistré pour la forme SufA-SSH traitée avec un fort excès d'iodoacétamide comporte six pics. Le premier correspond à la forme apo de SufA ($m/z=1306,6$; $z=11$). Les deux suivants correspondent aux formes soufrées de SufA, contenant respectivement 1 ($m/z=1309,7$; $z=11$) et 2 ($m/z=1312,8$; $z=11$) atomes de soufre. Les trois derniers sont attribués respectivement aux formes contenant un atome de soufre et un groupement acétamide ($m/z=1314,7$; $z=11$), deux atomes de soufre et un groupement

acétamide ($m/z=1317,8$; $z=11$) et 3 atomes de soufre et un groupement acétamide ($m/z=1320,7$; $z=11$). Il est important de remarquer :

(1) que la forme de SufA contenant 3 atomes de soufre n'est pas visible ; il est possible que le pic correspondant, en général de plus faible intensité que celui de la forme contenant 2 atomes de soufre, se trouve au niveau de l'épaule du pic « 1S+1R » vers $m/z = 1314$, $z=11$.

(2) qu'aucun pic indiquant l'addition de plusieurs groupements acétamide sur SufA-SSH n'apparaît ; on observe uniquement l'addition d'un groupement acétamide (« +1R »). Je rappelle qu'avec apoSufA, nous avons 3 alkylations, indiquant que les 3 cystéines de l'apoprotéine réagissent avec l'iodoacétamide.

Lorsque l'expérience est reproduite avec le mutant SufA_{C50S}, seules les formes soufrées (correspondant à l'addition de 1, 2 ou 3 atomes de soufre) sont visibles après traitement avec l'iodoacétamide (figure I-40) ; en effet, aucun pic correspondant à l'addition de groupements acétamide n'est observé. L'expérience n'a pas été répétée avec les mutants SufA_{C114S} et SufA_{C116S}, puisque ces derniers ne fixent pas de soufre.

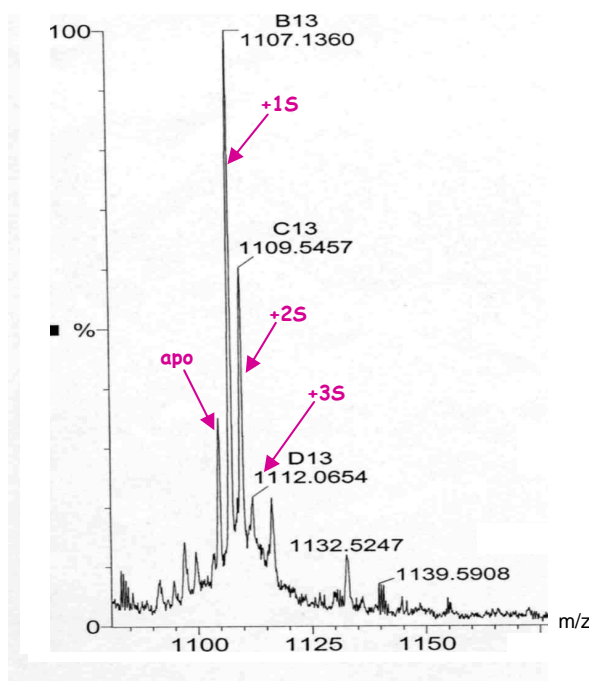


Figure I-40 : spectre de masse de SufA_{C50S} (500 nM) après transfert de soufre depuis le complexe SufSE et traitement avec 25 excès molaires d'iodoacétamide à température ambiante puis dessalage. (S = atome de soufre). Seul l'état de charge $z = 13$ est représenté.

Ces résultats indiquent :

(1) que l'unique alkylation observée dans le cas de la protéine sauvage se produit au niveau de la Cys50,

(2) que les atomes de soufre situés au niveau des cystéines Cys114 et Cys116 ne sont pas réactifs vis-à-vis de l'iodoacétamide. Ceci suggère que les persulfures/polysulfures au niveau des cystéines C-terminales ne sont pas nucléophiles.

L'échantillon SufA-SSH (protéine sauvage), après la réaction d'alkylation, a également été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF après digestion par l'endoprotéinase LysC (figure I-41). Pour le peptide [47-65] contenant la Cys50 (spectre a), on observe deux pics, l'un correspondant à la forme apo ($M = 1975,2$ Da), l'autre à l'addition d'un atome de soufre et d'un groupement acétamide ($M = 2063,56$ Da). L'analyse du peptide C-terminal [110-130] (spectre b) révèle clairement la présence de la forme apo ($M = 2365,5$ Da) et d'une forme soufrée contenant un atome de soufre ($M = 2398,35$ Da). Le pic indiquant la fixation de 2 atomes de soufre sur ce peptide ($M = 2430,35$ Da) est beaucoup moins intense mais néanmoins visible et attribuable sans ambiguïté. Par ailleurs, on observe un pic de faible intensité ayant une masse $M = 2455,47$ Da, qui pourrait correspondre à l'addition d'un atome de soufre et d'un groupement acétamide sur le peptide. Toutefois, cette forme est très minoritaire par rapport à la forme de SufA ayant fixé un atome de soufre et est donc négligeable. Les pics correspondant à l'alkylation des autres formes de ce peptide (formes apo + R ; 2S + R) ne sont pas détectés.

L'ensemble de ces expériences fournit des résultats cohérents. En effet, les analyses de spectrométrie de masse ESI-Q-TOF et MALDI-TOF montrent que le soufre fixé au niveau de la cystéine Cys50 est réactif vis-à-vis de l'iodoacétamide, tout comme le sont les atomes de soufre fixés sur CsdE, indiquant que le persulfure au niveau de la cystéine Cys50 de SufA est nucléophile. En revanche, les cystéines Cys114 et Cys116 ne sont pas, ou très peu, réactives à l'iodoacétamide, suggérant que les atomes de soufre localisés sur ces cystéines ne sont pas stockés sous forme d'entités nucléophiles.

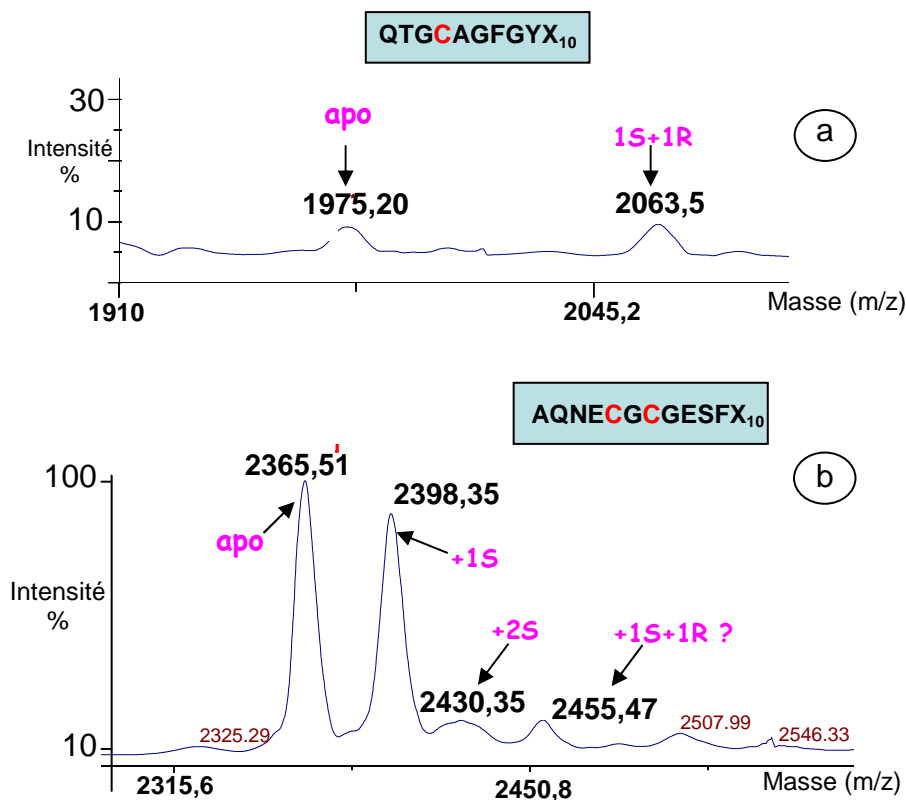


Figure I-41 : spectres MALDI de SufA-SSH après traitement avec 25 excès molaires d'iodoacétamide et digestion par l'endoprotéinase Lys-C. Seuls les spectres des peptides [47-65] (a) et [110-130] (b) sont représentés.

II- Formation du centre [Fe-S] en milieu réducteur

Les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent montrent que SufA est capable de fixer à la fois du fer et du soufre, au niveau de sites indépendants, mais que ces deux entités ne réagissent pas pour former un cluster [Fe-S]. De plus, les atomes de soufre stockés au niveau des cystéines Cys114 et Cys116 ne sont pas nucléophiles, comparés à d'autres atomes de soufre localisés au sein de persulfures du type de ceux de CsdE. Ceci peut expliquer l'absence de réaction lors de l'incubation de la forme SufA-SSH avec du fer (ou inversement, incubation de la forme SufA-Fe avec SufSE-SSH), et donc l'incapacité des formes intermédiaires à former des centres [Fe-S]. Nous nous sommes alors demandés si la présence d'électrons ne permettrait pas la formation d'un centre [Fe-S] à partir des formes intermédiaires étudiées. Nous avons donc modifié les conditions expérimentales en ajoutant un réducteur dans le milieu réactionnel et étudié dans ces conditions, par spectroscopie UV-visible et Mössbauer, l'éventuelle formation de centres [Fe-S] à partir de la forme SufA-SSH.

II-1- A partir de la forme SufA-SSH

II-1-1-Effet du DTT

Nous avons tout d'abord choisi d'apporter des électrons par l'intermédiaire du DTT ; la forme SufA-SSH, préparée en conditions catalytiques (1,45 atomes de soufre par monomère, 950 μM) a été incubée avec du Fe(II) (1,8 excès de fer par rapport à SufA) et un excès de DTT (6,3 mM). La solution protéique se colore instantanément (marron). Le spectre UV-visible obtenu après 5 minutes d'incubation et purification de l'échantillon sur colonne NAP10 (figure I-42a) est bien défini avec des bandes d'absorption à 320 nm et 420 nm, caractéristiques de la présence d'un centre [Fe-S]. De plus, il ne contient pas de bande d'absorption à 600 nm. Des spectres Mössbauer ont été enregistrés à 4,2 K et 78 K (figure I-42b). Ces deux spectres sont tout à fait similaires entre eux, ce qui suggère que la protéine contient uniquement des espèces diamagnétiques. Ils sont composés de deux doublets majoritaires (I et II) dont les paramètres sont caractéristiques d'un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, pour le doublet I, et d'un centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, pour le doublet II. Ils représentent respectivement 35 % et 15 % du fer total. Ces paramètres sont comparables avec ceux obtenus lors d'expériences réalisées précédemment au laboratoire avec SufA reconstituée chimiquement (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Les deux autres doublets (III et IV) correspondent à du fer(II), coordiné par des atomes de soufre dans un environnement tétraédrique (doublet III) ou coordiné par des atomes d'azote ou d'oxygène, dans un environnement octaédrique (doublet IV). Ces espèces correspondent à du Fe(II) n'ayant pas réagi. Les doublets III et IV représentent environ 50 % du fer total. Le temps d'incubation (5 minutes ou 1 heure) n'a aucun effet sur les proportions des centres [Fe-S] dans l'échantillon (environ 50 % au total), ce qui montre que la formation des centres [Fe-S] dans les conditions expérimentales utilisées se produit rapidement. Par contre, les proportions relatives des centres $[2\text{Fe-2S}]$ et $[4\text{Fe-4S}]$ varient légèrement avec le temps : après 1 heure d'incubation, les centres de type $[2\text{Fe-2S}]$ sont très minoritaires (moins de 4 %). Pour comparaison, on peut noter qu'une reconstitution chimique de SufA (1,2 mM) avec du fer ($^{57}\text{Fe}^{2+}$) et du soufre (S^{2-}) libres (2,1 mM) en présence de DTT (5 mM) réalisée sur 5 minutes conduit à la formation de centres $[2\text{Fe-2S}]$ et $[4\text{Fe-4S}]$, dans des quantités assez comparables (tableau I-12).

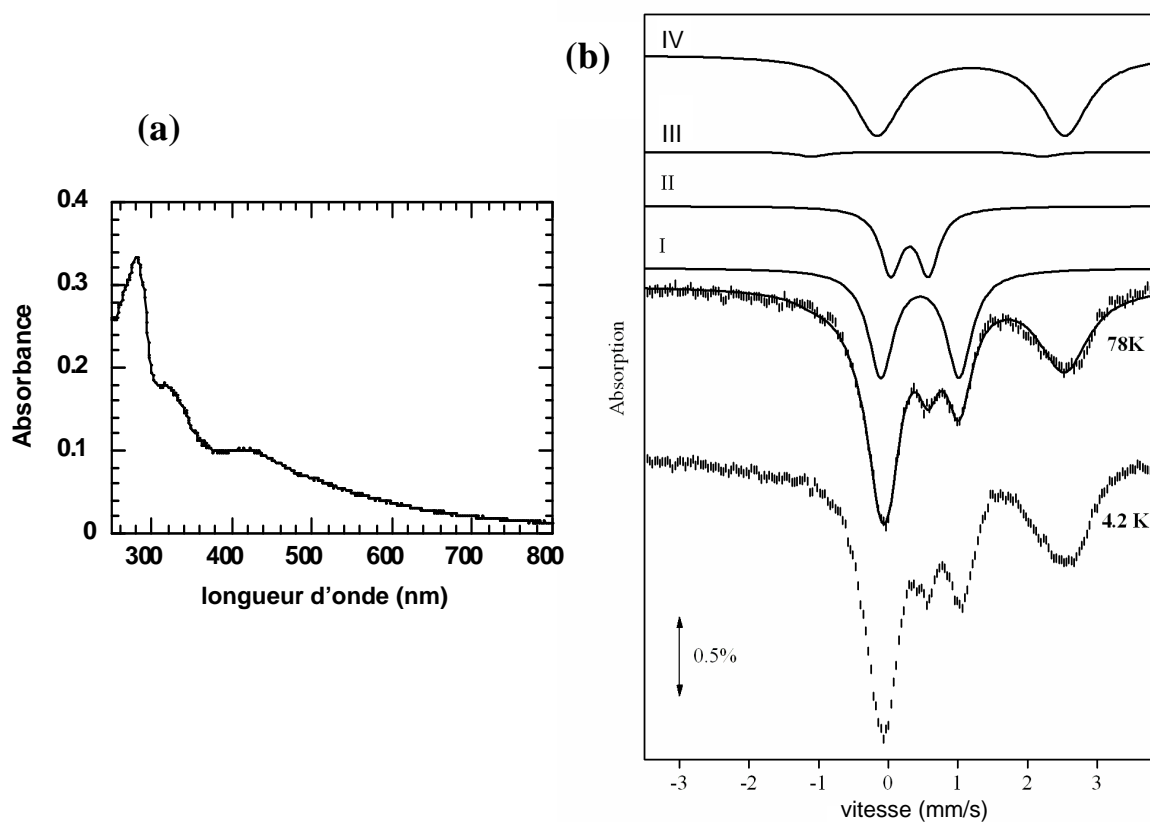


Figure I-42 : analyses spectroscopiques de SufA-SSH après traitement avec 1,8 excès de $^{57}\text{Fe}(\text{II})$ en présence de DTT (6 mM) pendant 5 minutes. (a) spectre UV-visible de SufA (25 μM) ; (b) spectres Mössbauer de SufA (1,75 mM, 1,5 fer/monomère)

Doublet	attribution	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire (%)
I	$[\text{4Fe-4S}]^{2+}$	0,45	1,2	35
II	$[\text{2Fe-2S}]^{2+}$	0,3	0,6	15
III	Fe^{2+} - tétraédrique Ligands S	0,71	3,2	3
IV	Fe^{2+} - octaédrique Ligands N/O	1,19	2,69	47

Tableau I-11 : paramètres Mössbauer correspondant aux doublets constituant le spectre I-42-b

	[4Fe-4S]²⁺ Aire (%)	[2Fe-2S]²⁺ Aire (%)	Fe²⁺ (octaédrique et tétraédrique) Aire (%)
SufA-SSH + Fe²⁺ + e⁻ (5 min)	35	15	50
SufA-SSH + Fe²⁺ + e⁻ (1 h)	46	<4	50
apoSufA + Fe²⁺ + S²⁻ + e⁻ (5 min)	58	<2	40
SufA-SSH + Fe²⁺ + système TTR (5 min)	30	20	31

Tableau I-12 : proportions relatives des centres [Fe-S] générés à partir de la forme SufA-SSH ou apoSufA
e⁻ = DTT ; TTR = système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.

II-1-2- Effet du système NADPH/thiorédoxine/thiorédoxine réductase

L'expérience a été répétée, sur 5 minutes, dans les mêmes conditions, le DTT ayant été remplacé par le système physiologique NADPH/thiorédoxine/thiorédoxine réductase. Les résultats obtenus sont semblables, avec un mélange de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] dont les proportions sont indiquées dans le tableau I-12. Le reste du fer (19 %) est présent sous forme d'agrégats paramagnétiques et correspond certainement à des impuretés.

L'ensemble de ces données révèle que, en présence d'électrons, les atomes de soufre présents dans la forme SufA-SSH peuvent être mobilisés et réagir avec le fer pour assembler des clusters [4Fe-4S] et [2Fe-2S].

II-2- A partir de la forme SufA-Fe

La forme SufA-Fe (1,5 mM), contenant 1,5 atomes de Fe(II) par monomère, a été traitée avec du soufre (apport de 1,5 atomes de soufre par monomère de SufA) introduit sous forme chimique (Na₂S), en présence de DTT (10 mM), pendant 5 minutes. La solution protéique devient marron quasiment instantanément. Le spectre UV-visible (figure I-43a) est caractéristique de la présence de centres [Fe-S] puisqu'il contient deux bandes d'absorption bien marquées à 320 nm et 420 nm. D'autre part, l'analyse par spectroscopie Mössbauer (figure I-43b) révèle la présence de centres [4Fe-4S]²⁺ uniquement (43 %), le reste du fer

étant essentiellement sous forme de Fe^{2+} coordonné majoritairement par des atomes d'azote ou d'oxygène.

Cette expérience démontre que les atomes de fer fixés sur SufA sont disponibles pour l'assemblage de centres [Fe-S] au sein de la protéine en milieu réducteur.

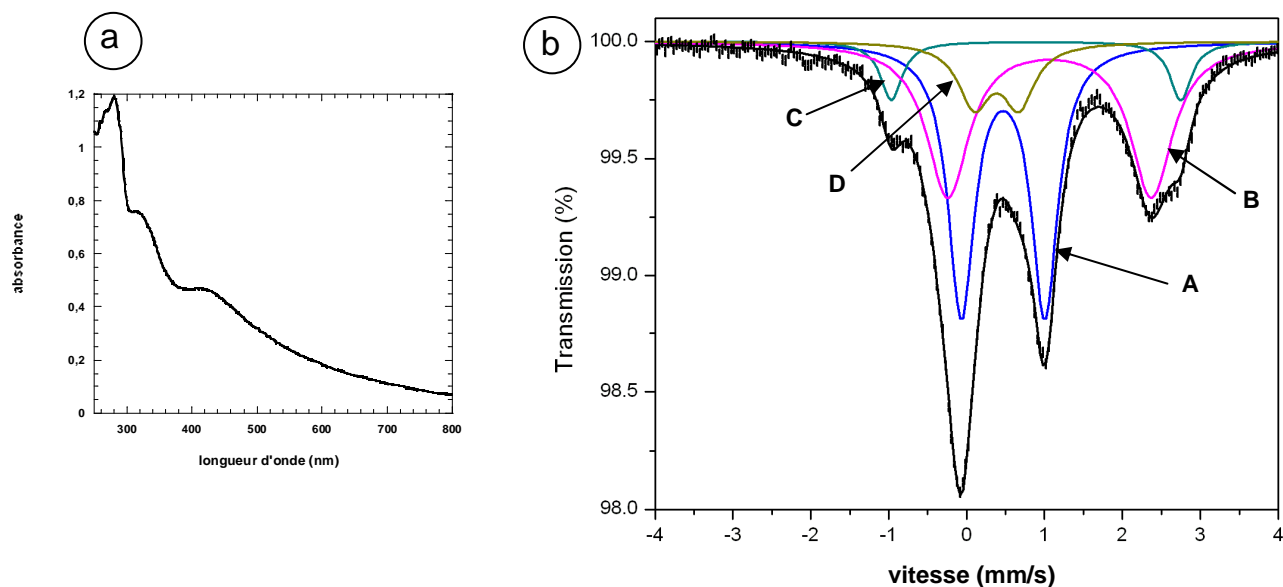


Figure I-43 : analyses spectroscopiques de SufA-Fe après 5 minutes d'incubation avec un équivalent d'ions sulfures par rapport au fer présent initialement dans SufA et dessalage. (a) spectre UV-visible de SufA (85 μM) ; (b) spectre Mössbauer, enregistré à 4,2 K, de SufA (2 mM, 1,5 fer/monomère)

Doublet	attribution	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire (%)
A	$[\text{4Fe-4S}]^{2+}$	0,47	1,07	43
B	Fe^{2+} - octaédrique ligands N/O	1,07	2,62	38
C	Fe^{2+} - tétraédrique ligands S	0,89	3,72	8
D	Indéterminée impuretés ? centres $[\text{2Fe-2S}]$?	0,38	0,57	11

Tableau I-13 : paramètres Mössbauer correspondant aux doublets constituant le spectre I-43-b

II-3- Etude d'une forme de SufA à la fois chargée en fer et en soufre

Nous avons montré que les formes intermédiaires SufA-SSH et SufA-Fe ne conduisent pas à la formation de centres [Fe-S] après ajout de l'élément manquant, sans apport d'électrons. En revanche, en présence de DTT ou du système Thiorédoxine/thiorédoxine réductase, nous observons jusqu'à 50 % de centres [Fe-S], présents sous forme d'un mélange de centre de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S] (figure I-44).

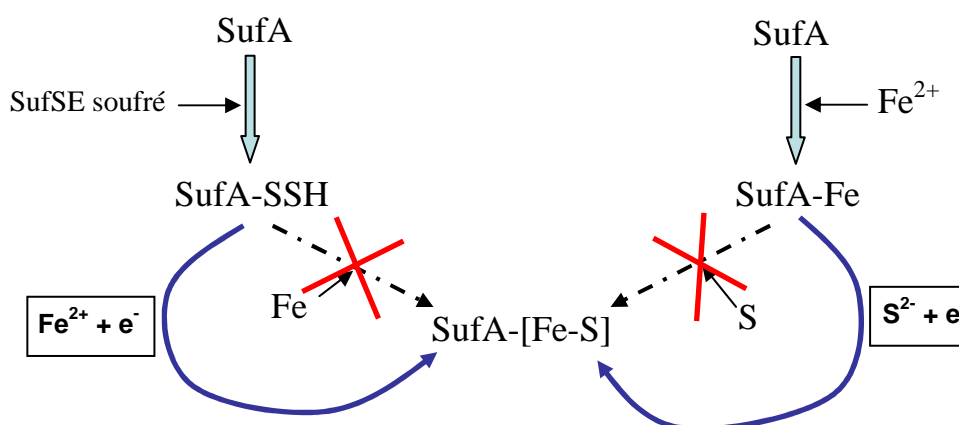


Figure I-44 : voies de synthèse possibles pour la formation de centres [Fe-S] au sein de SufA.

D'autre part, l'ensemble des résultats présentés jusqu'à présent révèlent que SufA est capable de fixer à la fois du fer et du soufre, au niveau de sites distincts, sans réaction de ces éléments l'un avec l'autre. Nous avons alors étudié la réactivité d'une protéine préalablement chargée à la fois en fer et en soufre, en milieu réducteur, pour la formation des centres [Fe-S]. En effet, la présence des deux éléments dans leur site respectif pourrait correspondre à une situation favorable pour la formation des centres [Fe-S] dans la protéine.

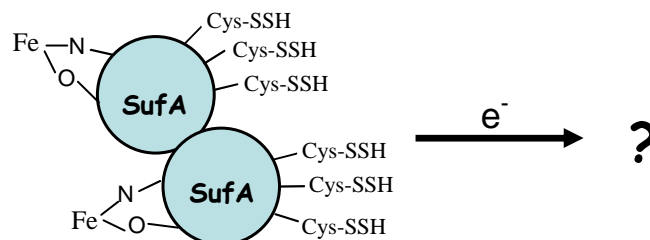


Figure I-45 : représentation schématique de la réaction étudiée ; -SSH représente les persulfures sur les cystéines de SufA, le fer étant localisé ailleurs dans la protéine, coordonné par des atomes d'azote et d'oxygène.

Nous avons tout d'abord préparé la forme soufrée SufA-SSH en incubant la protéine SufA (400 μM) avec des quantités catalytiques de SufS (12 μM), SufE (12 μM) et un excès de L-cystéine (10 mM) pendant 3 heures à 37 °C. Après purification sur colonne NAP10, la protéine est ensuite traitée avec 4 excès molaire de $^{57}\text{Fe}(\text{II})$ pendant 1 heure puis dessalée. Une analyse de spectrométrie de masse a permis de vérifier la fixation du soufre sur SufA (1,4 atomes de soufre par monomère). Un dosage de fer a révélé que SufA contenait également 1,5 atomes de fer par monomère. La protéine ainsi obtenue (1,2 mM), chargée à la fois en soufre et en fer a alors été mise en présence d'un excès de DTT (6 mM) pendant 5 minutes puis caractérisée par spectroscopie UV-visible et Mössbauer. Tout d'abord, on remarque que l'échantillon prend une coloration marron quasiment instantanément. De plus, le spectre UV-visible (figure I-46a) se caractérise par la présence d'une bande d'absorption à 420 nm ; la bande d'absorption à 320 nm est très peu prononcée voire inexistante. Enfin, le spectre Mössbauer, enregistré à 4,2 K (figure I-46b), est composé de deux doublets de contribution égale. Le premier ($\delta = 0,45 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1,24 \text{ mm/s}$) correspond à des centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ (50 % du fer total) et le deuxième ($\delta = 0,72 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 3,62 \text{ mm/s}$) à du Fe^{2+} dans un environnement tétraédrique (50 % du fer total), et coordiné par des atomes de soufre. Cette espèce peut correspondre à un complexe Fe-DTT restant dans l'échantillon.

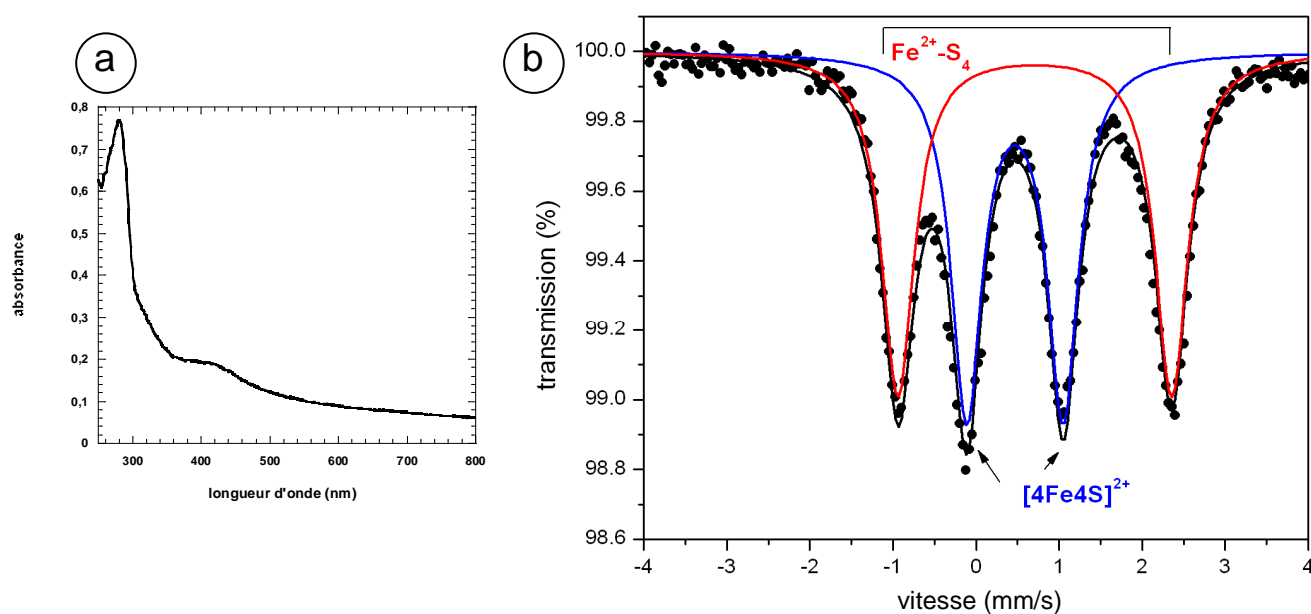


Figure I-46 : analyses spectroscopiques de SufA chargée en fer et en soufre après 5 minutes d'incubation avec du DTT (6 mM) et dessalage ; (a) spectre UV-visible de SufA (55 μM) ; (b) spectre Mössbauer, enregistré à 4,2 K, de SufA (1,5 mM, 1,5 fer/monomère).

L'expérience a été reproduite en laissant le DTT agir pendant 3 heures. La quantité de centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ déterminée dans l'échantillon après une analyse par spectroscopie Mössbauer est alors plus faible (environ 35 %). Le reste du fer est présent sous forme de Fe^{2+} coordonné par des atomes d'azote ou d'oxygène dans un environnement octaédrique (44 %) et de Fe^{2+} dans un environnement tétraédrique, coordonné principalement par des atomes de soufre (21 %). On remarque donc qu'avec le temps, les proportions des espèces correspondant à du Fe(II) n'ayant pas réagi ont changé (la proportion de Fe(II) coordonné par des atomes de soufre est plus faible et une coordination par des atomes d'azote et d'oxygène apparaît).

Ces résultats sont importants puisqu'ils montrent que dans une forme de SufA chargée en fer et en soufre, ces éléments peuvent être mobilisés conjointement pour la formation de centres [Fe-S] en présence d'un réducteur. Cependant, on n'augmente pas la quantité de centres [Fe-S] formés, par rapport aux expériences précédentes, ceux-ci représentant au maximum 50 % du fer total.

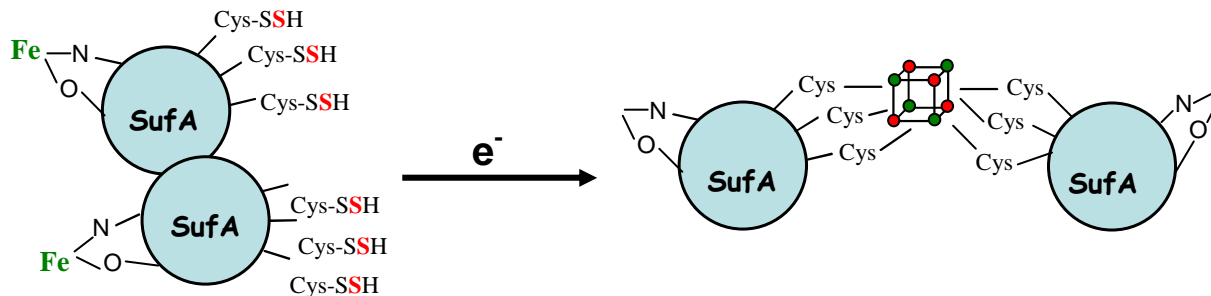


Figure I-47 : représentation schématique de l'obtention d'un centre [Fe-S] dans SufA, représentée sous forme dimérique, à partir d'une forme de SufA chargée en soufre et en fer.

Discussion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires d'assemblage des centres [Fe-S] au sein des protéines scaffold, en prenant comme modèle d'étude la protéine SufA d'*E. coli*. Cette classe de protéines, je le rappelle, appartient aux machineries protéiques permettant la maturation des protéines [Fe-S]. De fait, leur fonction

est de préassembler les centres [Fe-S] pour les transférer aux apoprotéines cibles. Notre objectif était de déterminer si les formes intermédiaires (SufA chargée en fer ou SufA chargée en soufre), pouvaient réagir avec l'élément manquant pour conduire à la formation de centres [Fe-S].

L'étude des mécanismes moléculaires d'assemblage des centres [Fe-S] au sein de protéines scaffold a déjà fait l'objet de plusieurs études qui sont controversées. En effet, différentes équipes de recherche se sont intéressées à cette problématique, en essayant de déterminer les intermédiaires clé dans le processus de formation des centres [Fe-S]. Johnson et coll. ont montré que la protéine IscU d'*A. vinelandii* est capable de fixer du soufre, sous forme de persulfures/polysulfures après transfert depuis la cystéine désulfurase IscS (Smith *et al.*, 2001). De plus, des analyses spectroscopiques (UV-visible, dichroïsme circulaire, Mössbauer) ont révélé que la protéine ne fixe pas de fer, quel que soit son degré d'oxydation (Smith *et al.*, 2001). Ces auteurs soutiennent donc plutôt l'hypothèse selon laquelle le soufre est incorporé en premier lors de l'assemblage des centres [Fe-S] au sein de IscU d'*A. vinelandii*. Toutefois, il est important de mentionner qu'ils n'ont pas réussi à former un centre [Fe-S] à partir de la forme chargée en soufre, IscU-SSH, après ajout de Fe(II). Parallèlement, Cowan et coll. affirment, après avoir décrit que IscU de *T. maritima* présente une forte affinité pour le fer (voir discussion chapitre III), qu'il est possible de former un centre [Fe-S] au sein de la protéine en traitant la forme chargée en fer (Fe²⁺), IscU-Fe, avec la cystéine désulfurase IscS et un excès de cystéine libre (Nuth *et al.*, 2002). Cependant, on peut noter que Cowan et coll. n'ont fourni aucune donnée (caractérisation spectroscopique) concernant la formation du cluster. D'autre part, Cowan et coll. montrent que IscU est capable de fixer du soufre. Cependant, cette forme (IscU chargée en soufre) n'a pas la capacité de fixer du fer ultérieurement (Nuth *et al.*, 2002). Cette équipe est donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle le fer est incorporé en premier lors de l'assemblage des centres [Fe-S] au sein de IscU de *T. maritima*.

Dans notre cas, nous avons montré que SufA d'*E. coli* est capable de fixer du soufre, celui-ci étant localisé au niveau des cystéines conservées sous forme de persulfures/polysulfures, ainsi que du fer, celui-ci étant coordonné majoritairement par des ligands azotés ou oxygénés. Cependant, lorsque ces deux éléments sont sur la protéine, ils ne réagissent pas pour former un centre [Fe-S]. Les études menées sur la forme SufA-SSH nous suggèrent que cette absence de réaction est due au fait que les atomes de soufre coordonnés par

les cystéines C-terminales ne sont pas nucléophiles. En effet, les expériences d'alkylation de la forme SufA-SSH ont montré que les atomes de soufre fixés au niveau des cystéines C-terminales ne sont pas réactifs à l'iodoacétamide. Pour référence, nous avons étudié les entités persulfure et polysulfure de CsdE, et montré qu'elles réagissent avec l'iodoacétamide et qu'elles sont donc nucléophiles. Le persulfure et le polysulfure observés sur CsdE sont linéaires, puisque, je le rappelle, CsdE, ne contient qu'une seule cystéine. D'autre part, les expériences de mutagenèse dirigée présentées dans le chapitre II ont montré que les cystéines Cys114 et Cys116 fonctionnent de pair pour fixer du soufre. De par tous ces résultats, nous pouvons penser que la forme SufA-SSH contient des persulfures/polysulfures atypiques, peut-être cycliques, au niveau des cystéines C-terminales. A ce niveau, il est légitime de se demander si cette forme, obtenue dans des conditions *in vitro*, correspond à un artefact ou reflète les conditions physiologiques. La « capture » de soufre sous forme non réactive, « cyclique » permet-elle d'éviter une éventuelle perte de soufre sous forme libre S^{2-} , à partir des persulfures que l'on sait être des entités très réactives ?

Malgré ce manque de réactivité, ayant montré que seuls les atomes de soufre sont localisés au niveau des cystéines conservées de SufA, il est tentant de proposer que le soufre est le premier élément incorporé au niveau du site actif lors de l'assemblage des centres [Fe-S]. C'est donc le mécanisme que l'on favorise. Toutefois, il n'est pas complètement exclu que le fer vienne se fixer en premier sur la protéine, mais au niveau d'un site différent que celui formé par les résidus cystéines.

Comme déjà mentionné, nos expériences ont montré que SufA est capable de fixer du soufre et du fer. Cependant, la forme SufA-SSH n'est pas réactive vis-à-vis du fer et la forme SufA-Fe ne conduit pas non plus à l'obtention de centres [Fe-S] après un apport de soufre par le complexe SufSE. Dans ce contexte, on peut remarquer que nous n'avons d'ailleurs même pas réussi à former un intermédiaire réactionnel dans la réaction de formation d'un centre [Fe-S], de type « SufA-S-S-Fe » par exemple, pour lequel les atomes de fer seraient coordonnés par les persulfures de SufA. En effet, les spectres Mössbauer de l'échantillon « SufA-SSH + Fe^{2+} » montrent que les atomes de fer sont coordonnés par des ligands azotés ou oxygénés mais pas par des ligands soufrés et les spectres de l'échantillon « SufA-Fe + SufSE-SSH » sont similaires à ceux obtenus pour la forme SufA-Fe seule.

En revanche, chacune des deux formes intermédiaires (SufA-SSH ou SufA-Fe) est capable d'assembler des centres [Fe-S] après ajout de l'élément manquant, en présence

d'électrons. De plus, une forme chargée à la fois en fer et en soufre peut également assembler des centres [Fe-S] après ajout d'électrons apportés sous forme de DTT. Tout ceci montre que, dans des conditions réductrices, les atomes de fer et de soufre fixés sur SufA, au niveau de sites distincts, sont mobilisables pour la formation de centres [Fe-S] au sein de la protéine.

L'ensemble de ces résultats peut se résumer par le schéma hypothétique suivant :

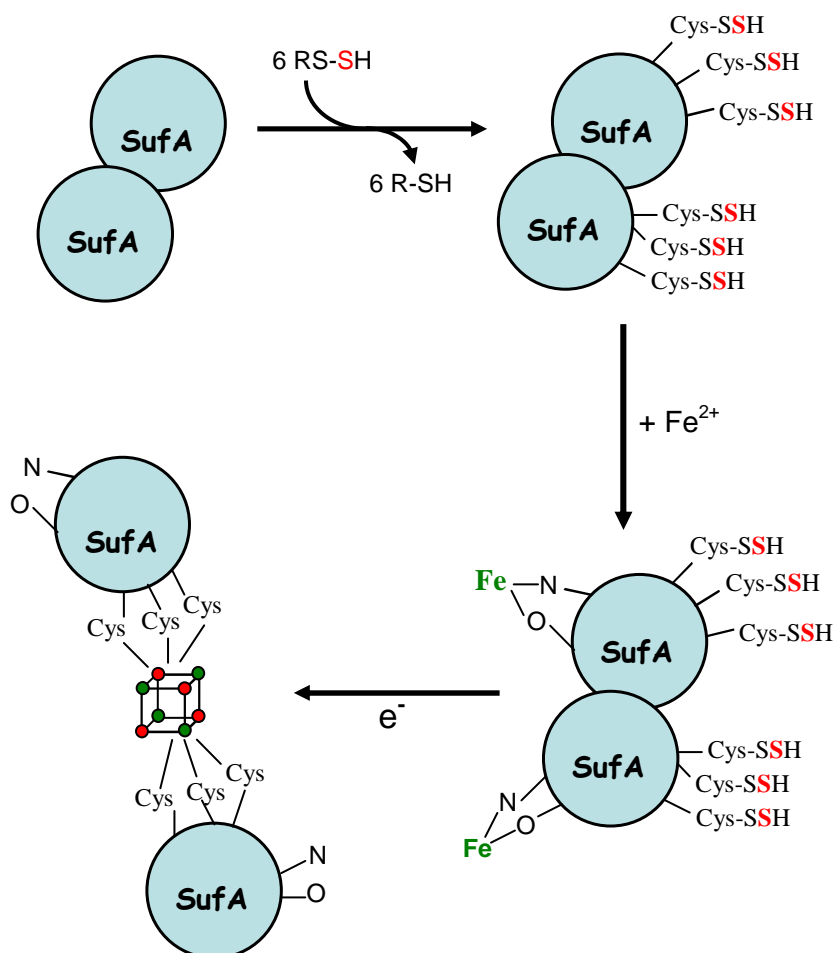


Figure I-48 : schéma proposé pour la formation d'un centre [Fe-S], ici de type [4Fe-4S], dans SufA (dimère).

Les agents réducteurs ajoutés lors des réactions de formation du cluster (DTT ou système thiorédoxine/thiorédoxine réductase) permettent la conversion du soufre, présent initialement sur SufA sous forme de persulfures au degré d'oxydation 0, en ions sulfures S²⁻. Ces conditions expérimentales (ajout d'un réducteur) pourraient ressembler à celles d'une reconstitution chimique, qui correspond à SufA apo traitée avec un excès de Fe²⁺ et S²⁻ en présence de DTT. Toutefois, on remarque que les proportions de centres [Fe-S] produits après traitement de la forme SufA-SSH avec du Fe(II) en présence d'électrons sont différentes de celles obtenues après reconstitution chimique (tableau I-12), ou lorsque le fer est fixé en

premier sur la protéine, ce qui peut suggérer que, dans le premier cas, la réaction ne se produit pas simplement par une libération d'ions sulfures en solution. Lorsque la réaction est réalisée à partir d'une forme de SufA à la fois chargée en fer et en soufre, et après ajout de DTT, les proportions de centres [Fe-S] formés (50 % de clusters, de type $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ uniquement) sont encore différentes de celles observées lorsque la forme SufA-SSH est utilisée comme matériel de départ (35 % $[4\text{Fe-4S}]$ et 15 % $[2\text{Fe-2S}]$). On peut donc penser également que les mécanismes réactionnels sont encore différents lorsque le fer et le soufre sont déjà fixés sur la protéine.

Quoiqu'il en soit, il faut noter que la source physiologique permettant l'apport d'électrons n'est pas connue à ce jour.

Je terminerai en soulignant que l'apport d'électrons n'est peut-être pas la seule manière de rendre les éléments (atomes de fer et de soufre) fixés sur la protéine réactifs pour la formation d'un centre [Fe-S]. En effet, ce processus requiert peut-être la participation d'autres protéines. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé d'influence du complexe SufBCD. Ceci n'exclut pas qu'*in vivo*, ces protéines interviennent au cours de l'assemblage des centres [Fe-S] dans SufA. De plus, d'autres protéines, faisant par exemple partie de l'opéron *isc* ou n'ayant pas encore été identifiées pourraient également intervenir. Dans ce contexte, il aurait été intéressant d'étudier l'influence de la ferrédoxine lors de la formation des centres [Fe-S] dans SufA, même si cette protéine ne fait pas partie de l'opéron *suf*. De fait, cette protéine, qui joue un rôle rédox par l'intermédiaire de son centre [Fe-S], pourrait être capable de réduire les persulfures/polysulfures sur SufA et de rendre les atomes de soufre réactifs pour la formation de centres [Fe-S] au sein de SufA. D'autres protéines, telles que la thiorédoxine (démontré ici) ou la glutarédoxine pourraient également intervenir.

Partie II

Etude de la nature du centre métallique dans SufA

Introduction

Comme déjà mentionné en introduction, la protéine est obtenue principalement sous forme apo après purification et les expériences de reconstitution chimique du centre [Fe-S] dans SufA, réalisées jusqu'alors au laboratoire, ont conduit à l'obtention d'un mélange de clusters de type [4Fe-4S] et [2Fe-2S] dans des proportions variables (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Il est difficile de dire si ce dernier point correspond (1) à une propriété intrinsèque de la protéine, indiquant alors que SufA est capable d'assembler les deux types de centres, ou (2) à un artefact lié aux conditions expérimentales *in vitro*. En effet, il est possible que SufA contienne un centre [2Fe-2S] à partir duquel un centre [4Fe-4S] peut se former artificiellement en raison de l'excès de fer et de soufre présent dans le milieu réactionnel, ou alors que SufA contienne un centre [4Fe-4S] pouvant se décomposer en un centre [2Fe-2S].

Dans le but de déterminer la nature exacte du cluster dans SufA, nous avons suivi deux stratégies : (1) nous avons fait varier les conditions de reconstitution chimique, afin de voir s'il est possible d'obtenir une préparation homogène contenant un seul type de centre, (2) nous avons purifié la protéine SufA en conditions anaérobies de sorte à obtenir une protéine native métallée sans traitement chimique. Ce dernier point nous a également permis de trancher définitivement quant à la fonction de la protéine SufA, puisque, je le rappelle, plusieurs fonctions ont été proposées pour les protéines de type A (scaffold, donneur de fer ou régulateur).

I- Caractérisation de SufA après reconstitution chimique

I-1- Caractérisation biochimique et spectroscopique

Le protocole de reconstitution du centre [Fe-S] dans SufA, en présence de fer ferreux Fe^{2+} et d'ions sulfures S^{2-} , en conditions anaérobies, est décrit dans Matériels et Méthodes. Classiquement, la protéine SufA est incubée pendant 3 heures avec 4 excès molaires de fer et de soufre inorganiques. A l'issue de cette reconstitution, SufA contient des quantités équimolaires de fer et de soufre variant de 1,5 à 2,2 atomes de fer et de soufre par monomère. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment au laboratoire (Ollagnier-de-

Choudens *et al.*, 2004). De plus, ces valeurs sont compatibles avec la présence d'un centre [2Fe-2S] par monomère ou d'un centre [4Fe-4S] par dimère.

Nous avons alors fait varier les conditions de réaction lors de la reconstitution chimique et regardé si ces variations conduisaient à des proportions différentes de fer et de soufre au sein de la protéine. Nous avons introduit différents excès de fer et de soufre inorganiques (de 2 à 6 excès molaires par rapport à SufA), modifié le temps d'incubation (de 5 minutes à 4 heures), ajouté ou non de l'EDTA en fin de reconstitution dans le but de chélater le fer non spécifique. Les différentes conditions testées sont résumées dans le tableau II-1.

Excès de Fe^{2+} et S^{2-}	Temps d'incubation	Ajout d'EDTA	Expérience
4	3 heures	2 mM *	A
4	1 nuit	2 mM	B
2	30 minutes	-	C
2	5 minutes	-	D
0,5 excès (incubation 2 heures) puis 0,5 excès (incubation 2 heures) Soit au total 1 excès de Fe^{2+} et S^{2-} introduit pour un temps de réaction de 4 heures		-	E
2 (ajout des solutions de Fe^{2+} et S^{2-} très lentement, gouttes à gouttes) **	3 heures	-	F

Tableau II-1 : conditions de reconstitution testées. *conditions précédemment testées au laboratoire (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004) et reproduites ici. ** l'ajout des solutions a été réalisé à l'aide d'un appareil pousse seringue.

De façon générale, on a pu remarquer que quelles que soient les conditions expérimentales utilisées, SufA contient toujours, après dessalage, des quantités équimolaires de fer et de soufre variant de 1,5 à 2,3 atomes par monomère. Dans le cas de l'expérience E, dans laquelle 1 excès molaire de fer et de soufre par rapport à SufA a été ajouté, la protéine contient 0,8 atomes de fer et de soufre par monomère.

◆ Spectroscopie UV-visible

Toutes les préparations protéiques ont été analysées par spectroscopie UV-visible après reconstitution. Dans chaque cas, les spectres UV-visible sont similaires (figure II-1 a). Ces spectres, enregistrés en anaérobiose, entre 250 nm et 800 nm, présentent une bande de

transfert de charge $S \rightarrow Fe(III)$ située vers 420 nm, ainsi qu'une bande d'absorption vers 320 nm. Ces caractéristiques sont compatibles avec la présence d'un centre [Fe-S] plutôt de type [2Fe-2S] ; les centres [4Fe-4S] présentent une bande d'absorption à 320 nm beaucoup moins marquée. Des spectres UV-visible de protéines [4Fe-4S] (cas de la Spore Photoproduit Lyase) (Chandor *et al.*, 2006) et [2Fe-2S] (cas de la ferrédoxine) (Ta and Vickery, 1992) sont représentés ci-dessous pour exemple (figure II-1 b et c). Des données similaires (quantification du fer, spectres UV-visible) à celles obtenues avec SufA d'*E. coli* ont été précédemment obtenues au laboratoire dans le cas de IscA d'*E. coli*, de SufA d'*E. chrysanthemi* et de SufA d'*E. coli* (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003).

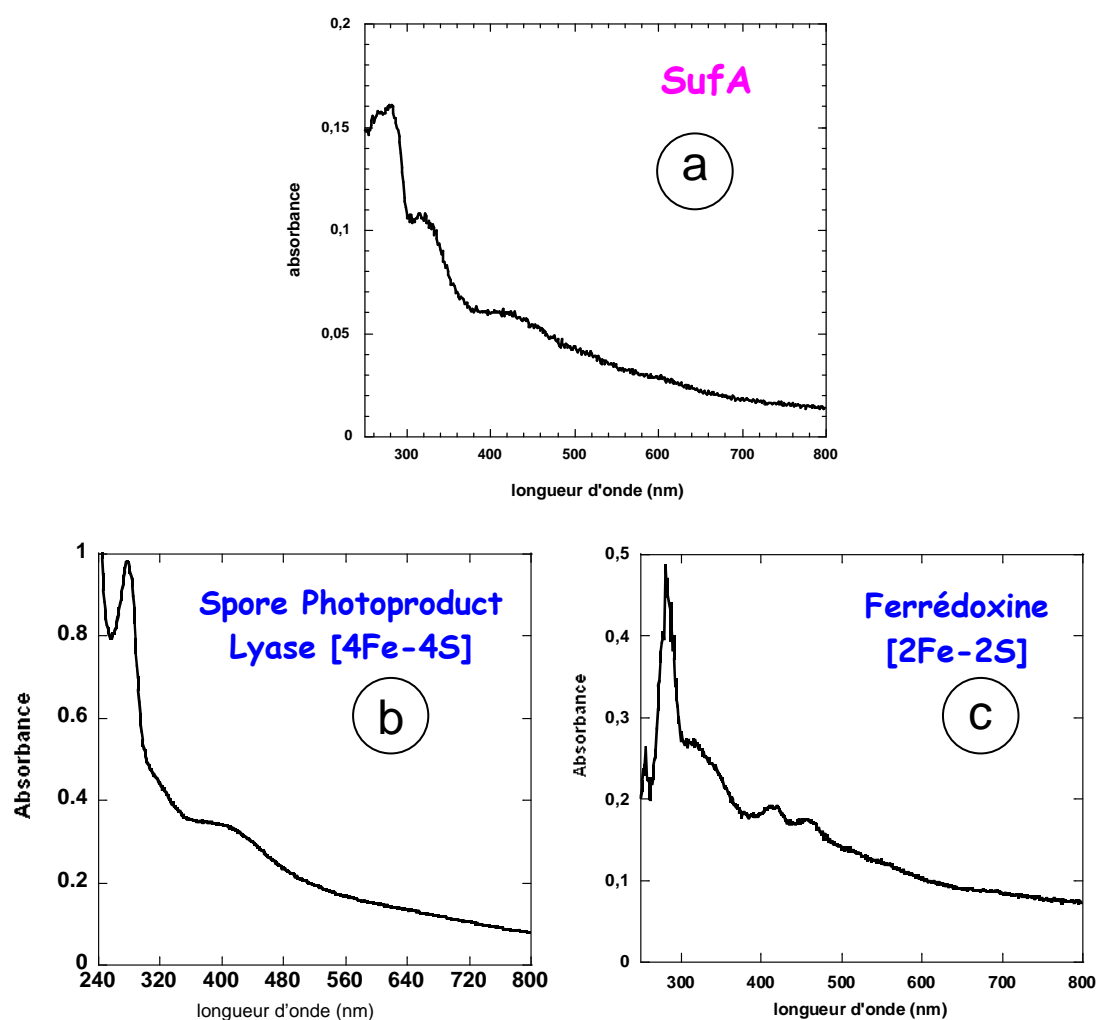


Figure II-1 : (a) spectre d'absorption UV-visible de SufA_{his} (12 μ M) après reconstitution chimique, enregistré dans une cuve de 1 cm de trajet optique. Dans ce cas, les conditions expérimentales étaient les suivantes : 2 excès molaires de fer et de soufre par rapport à SufA, 5 minutes d'incubation puis dessalage ; (b) spectre d'absorption UV-visible de la Spore Photoproduit Lyase (22 μ M) contenant un centre [4Fe-4S] ; (c) spectre d'absorption UV-visible de la ferrédoxine (42 μ M) contenant un centre [2Fe-2S].

Enfin, il est important de noter que les résultats sont identiques que l'on ait utilisé la protéine SufA_{his}, possédant une étiquette polyhistidine en C-terminal, ou la protéine SufA_{STOP}, n'en possédant pas, comme matériel de départ.

◆ Spectroscopie Mössbauer

Quelques préparations protéiques ont également été analysées par spectroscopie Mössbauer, après reconstitution. A la différence de l'UV-visible, on observe, par cette technique, quelques différences entre les échantillons.

Le premier échantillon étudié correspond à la protéine SufA_{his}, reconstituée avec 4 excès molaires de fer (^{57}Fe apporté sous forme de sel de Mohr) et de soufre (apporté sous forme de Na_2S), pendant 3 heures à 18°C. De l'EDTA (2 mM) est alors ajouté en fin d'expérience afin de chélater le fer non spécifique. Après 30 minutes de réaction, l'échantillon est purifié sur colonne G25, concentré et congelé en boîte à gants (tableau II-1, expérience A). Ces conditions correspondent à celles utilisées pour SufA d'*E. chrysanthemi* (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Le spectre Mössbauer de la protéine ainsi préparée, enregistré à 105 K, est présenté en figure II-2.

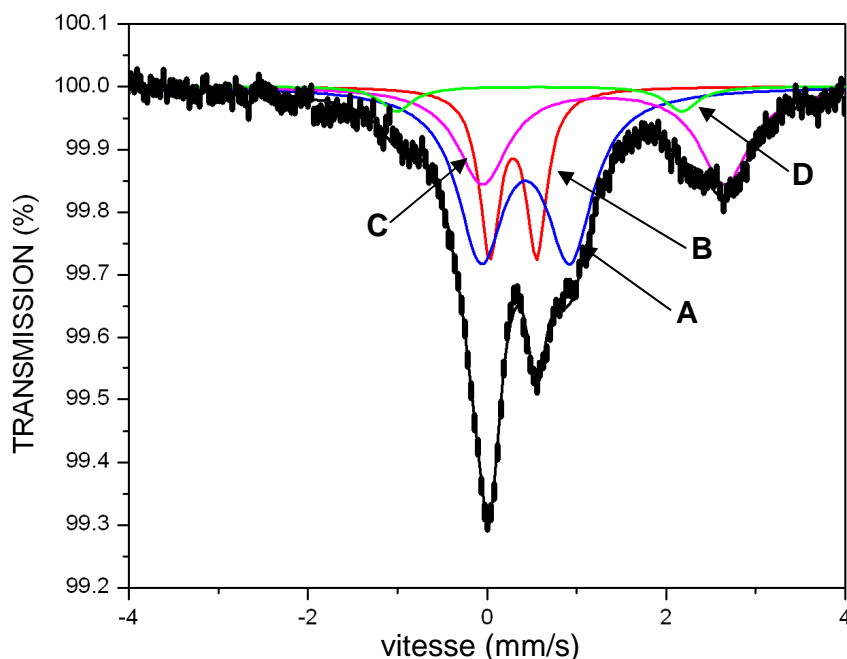


Figure II-2 : spectre Mössbauer de la protéine SufA reconstituée avec 4 excès molaires de fer et de soufre inorganiques, pendant 3 heures, puis traitée avec de l'EDTA (600 μM , 1,8 fer/monomère) enregistré à 105 K. Le spectre Mössbauer est constitué de 4 doublets définis dans la table II-2 et déterminés après des simulations théoriques.

Doublets	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Attribution	Aire (%)
A	0,43	1,00	$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	46
B	0,29	0,52	$[2\text{Fe-2S}]^{2+}$	21
C	1,30	2,70	Fe^{2+} octaédrique Ligands N/O	29
D	0,60	3,20	Fe^{2+} tétraédrique Ligands S	4

Tableau II-2 : paramètres Mössbauer des différentes espèces A, B, C et D.

Le spectre Mössbauer est composé de deux doublets majoritaires (A et B), dont les paramètres sont caractéristiques de centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ et $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ respectivement, ce qui a été confirmé par des analyses à 4,2 K. Ceci révèle donc la présence d'un mélange de centres [Fe-S] au sein de SufA (21 % de cluster $[2\text{Fe-2S}]$ et 46 % de cluster $[4\text{Fe-4S}]$, déterminés après analyses quantitatives), comme déjà observé lors de précédentes études menées au laboratoire sur SufA d'*E. chrysanthemi* (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Dans ce cas, il avait été observé 11 % de cluster $[2\text{Fe-2S}]$ et 40 % de cluster $[4\text{Fe-4S}]$. Le reste du fer (doublet C) correspond à du fer non spécifique coordonné majoritairement par des atomes d'azote et d'oxygène. Le doublet D, associé à du fer(II) coordonné par des atomes de soufre, correspond peut-être à un complexe Fe-DTT.

Dans le but de réduire, voire d'éliminer, la quantité de fer non spécifique présent dans l'échantillon, nous avons réduit l'excès de fer et de soufre inorganiques lors de la reconstitution, et travaillé avec un temps d'incubation plus court. Ainsi, la protéine SufA_{his} a été traitée avec 2 excès molaires de $^{57}\text{Fe}^{2+}$ et de S^{2-} pendant 5 minutes, puis dessalée. Le spectre Mössbauer correspondant (figure II-3), enregistré à 105 K, comporte un doublet largement majoritaire (doublet A), dont les paramètres sont caractéristiques d'un cluster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. Il représente 58 % du fer total. Une quantité infime de centres $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ est détectée (moins de 4 %, doublet B). Le reste du fer contenu dans l'échantillon est présent essentiellement sous forme de Fe^{2+} , dans un environnement octaédrique (doublet C). Ainsi, les centres de type $[2\text{Fe-2S}]$ contenus dans l'échantillon précédent peuvent être interprétés comme le résultat d'une dégradation des centres $[4\text{Fe-4S}]$ due à un temps d'incubation trop long. On note que dans les deux cas, on a en moyenne 65 % de centres [Fe-S] par monomère de SufA, ce qui montre que la formation de centres [Fe-S] par reconstitution chimique est

assez efficace. Elle est de plus rapide puisqu'en 5 minutes, nous obtenons une quantité de centre [Fe-S] similaire à celle observée après 3 heures de réaction. Il est intéressant de noter que le spectre obtenu pour la protéine SufA_{STOP}, reconstituée dans les mêmes conditions, est comparable. Ceci confirme encore une fois que l'étiquette polyhistidine n'est pas impliquée dans la fixation du fer et qu'elle n'interfère pas sur les propriétés d'assemblage des centres [Fe-S] de la protéine SufA.

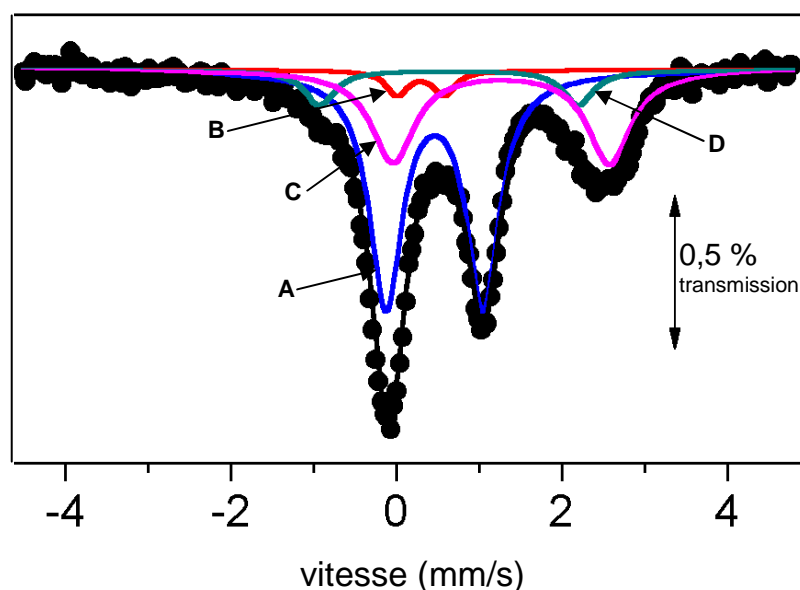


Figure II-3 : spectre Mössbauer de la protéine SufA reconstituée avec 2 excès molaires de fer et de soufre inorganiques, pendant 5 minutes (970 μ M, 1,65 fer/monomère), enregistré à 105 K. Des simulations théoriques ont permis de décomposer le spectre obtenu en 4 doublets définis dans la table II-3.

Doublet	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Attribution	Aire (%)
A	0,45	1,2	$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	58
B	0,3	0,6	$[2\text{Fe-2S}]^{2+}$	<4
C	1,2-1,3	2,7	Fe^{2+} - octaédrique Ligands N/O	30
D	0,6-0,7	3,2	Fe^{2+} - tétraédrique Ligands S	8

Table II-3 : paramètres Mössbauer des différents doublets A, B, C et D

Dans le but de réduire encore la quantité de fer non spécifique présent dans la protéine et de permettre un assemblage progressif du cluster, un troisième échantillon a été préparé comme suit : SufA a été incubée avec 0,5 excès molaires de Fe^{2+} et S^{2-} pendant 2 heures. 0,5 excès molaires de Fe^{2+} et S^{2-} ont alors été ajoutés à nouveau. Après 2 heures supplémentaires d'incubation, l'échantillon est purifié sur colonne NAP10. Dans ce cas, l'analyse par spectrométrie Mössbauer a révélé que la majorité du fer présent dans SufA se trouve sous forme de Fe^{2+} coordonné par des atomes d'azote ou d'oxygène, ainsi que sous forme d'agrégats paramagnétiques. Seulement 10 % de centres [Fe-S] (mélange de centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ et $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$) sont détectés.

I-2- Etude du transfert des centres [Fe-S] de SufA

Ayant montré la présence de centres [Fe-S] dans SufA d'*E. coli*, dans des proportions significatives, après une reconstitution chimique effectuée sur 5 minutes, nous avons ensuite testé la capacité de SufA à transférer ces centres [Fe-S] assemblés « rapidement » à une apoprotéine cible. Pour cette étude, nous avons choisi des protéines cibles de natures différentes : la Spore Photoproduit Lyase de *B. subtilis* (SPL), une protéine [4Fe-4S] (Chandor *et al.*, 2006), et la Ferrédoxine de l'opéron *isc* d'*E. coli* (Fdx), une protéine [2Fe-2S] (Ta and Vickery, 1992).

La ferrédoxine est obtenue sous forme holo après purification. Elle présente une coloration rouge bien prononcée, témoin de la présence de son centre $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$. Nous avons donc tout d'abord préparé la forme apo en incubant la protéine avec un excès de DTT et d'EDTA, comme décrit dans Matériels et Méthodes. La ferrédoxine apo ainsi obtenue est alors incubée avec 2 excès molaires d'holoSufA (obtenue après reconstitution chimique pendant 5 minutes et contenant 1,6 atomes de fer/monomère), en présence de DTT (5 mM), pendant 30 minutes, en conditions anaérobies. Ceci permet donc de fournir l'équivalent de 3,2 atomes de fer par ferrédoxine, ce qui représente un léger excès pour l'assemblage d'un centre [2Fe-2S] au sein de la protéine. Dans cette expérience, on utilise ensuite les différences de propriété entre SufA, contenant une étiquette polyhistidine et la protéine cible, la ferrédoxine, qui n'en contient pas, pour les séparer. Après incubation, le mélange réactionnel est déposé sur une colonne Ni-NTA, avec laquelle SufA interagit. En revanche, la ferrédoxine est retrouvée dans la fraction de lavage. SufA est alors récupérée après élution de la colonne avec une solution contenant de l'imidazole. Après cette étape de séparation, la fraction protéique

contenant la ferrédoxine est caractérisée spectroscopiquement et biochimiquement. Le spectre UV-visible (figure II-4a) comporte des bandes d'absorption à 415 nm et 460 nm, caractéristiques du centre $[2Fe-2S]^{2+}$ de la ferrédoxine. De plus, un dosage de fer révèle que la ferrédoxine contient 1,35 atomes de fer par monomère, alors qu'il ne reste que très peu de fer dans SufA (0,15 atome de fer et de soufre par monomère). La présence d'un cluster intègre au sein de la ferrédoxine a été confirmée par spectroscopie RPE : après réduction de l'échantillon avec un excès de dithionite, le signal RPE enregistré est tout à fait caractéristique du centre $[2Fe-2S]^{1+}$ de la ferrédoxine, avec des valeurs de g à 1,99 et 1,91 (figure II-4b), similaires à celles observées par Vickery et coll. lors de la caractérisation de la ferrédoxine d'*E. coli* (Ta and Vickery, 1992) (figure II-4c).

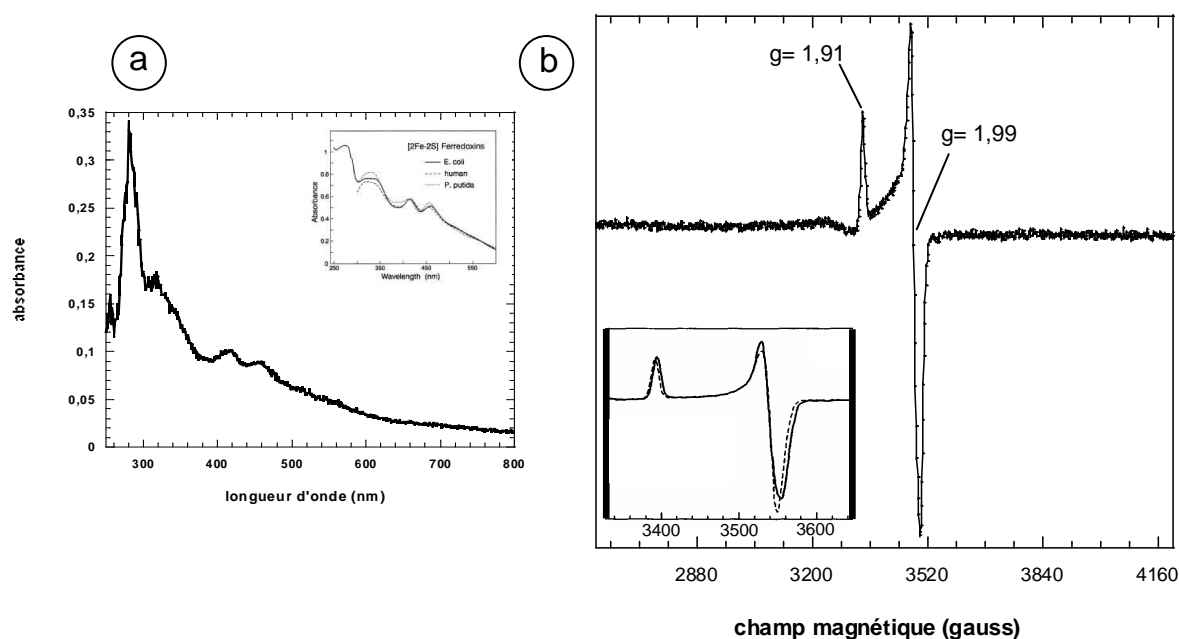


Figure II-4 : (a) spectre UV-visible de la ferrédoxine (30 μ M) obtenu après incubation avec 2 excès molaires d'holoSufA pendant 30 minutes puis séparation sur colonne d'affinité NiNTA (insert : spectre UV-visible de la ferrédoxine obtenue après purification (Ta and Vickery, 1992)) ; (b) spectre RPE de la ferrédoxine (200 μ M) après réduction au dithionite (2 mM), les conditions d'enregistrement étant : température 10 K, puissance 0,1 mW, gain $2 \cdot 10^4$, modulation d'amplitude 10 G ; (insert : spectre RPE de la ferrédoxine après purification puis réduction (Ta and Vickery, 1992) et servant de référence)

La réaction de transfert du cluster de SufA à la ferrédoxine a été reproduite plusieurs fois. Nous avons procédé à une quantification du signal RPE, dans des conditions non saturantes, par comparaison avec une solution standard de CuEDTA (1 mM). Cette analyse révèle que la quantité de centre $[Fe-S]$ réduit au sein de la ferrédoxine correspond à 60-65 %

du fer total, et est similaire à celle observée précédemment au laboratoire en utilisant une protéine SufA reconstituée avec 4 excès de fer et de soufre pendant 3 heures (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Tout ceci démontre que la forme holoSufA obtenue après incubation avec du fer et du soufre inorganiques pendant 5 minutes contient des entités [Fe-S] efficacement transférables à la ferrédoxine.

Le même type d'expérience a été répété avec la Spore Photoproduit Lyase comme protéine acceptrice. La Spore Photoproduit Lyase sous forme apo, obtenue après traitement de la protéine avec un excès de DTT et d'EDTA, est incubée avec 3 excès molaires de holoSufA (1,6 fer/monomère), en présence de DTT, en conditions anaérobies. Ceci correspond à un excès de 4,8 fer/monomère de SPL, c'est-à-dire une quantité quasi stoechiométrique pour l'assemblage d'un centre [4Fe-4S] dans la protéine. Après 30 minutes de réaction, les deux protéines sont séparées par chromatographie d'affinité, selon un protocole similaire à celui décrit précédemment dans le cas de la ferrédoxine. Cependant, dans le cas présent, la SPL contient une étiquette polyhistidine et est donc retenue sur la colonne NiNTA, alors que la protéine SufA utilisée est la forme SufA_{STOP}, ne possédant pas d'extension polyhistidine, et est récupérée dans la fraction de lavage. Après séparation, la SPL contient 3,2 atomes de fer par monomère, et SufA seulement 0,3 atome de fer par monomère. Le spectre UV-visible de la Spore Photoproduit Lyase (figure II-5a) comporte des bandes d'absorption à 320 nm et 420 nm, signe de la présence d'un centre [Fe-S] dans la protéine. Il est cependant moins bien défini que figure II-1b.

Le transfert du cluster de SufA à la Spore Photoproduit Lyase a également été étudié en mesurant l'activité enzymatique de cette dernière après différents temps d'incubation avec holoSufA. En effet, comme mentionné en introduction, la Spore Photoproduit Lyase appartient à la famille des protéines « Radical-SAM » et requiert la participation de son centre [4Fe-4S] et de la S-adénosylméthionine (SAM) pour la transformation de son substrat, le spore photoproduit (SpTpT). La disparition du substrat et l'apparition du produit final, mesurées comme décrit dans Matériels et Méthodes, sont donc les témoins d'une protéine active et correctement maturée, c'est-à-dire possédant un centre [4Fe-4S] intègre, et indiquent donc que la Spore Photoproduit Lyase a acquis son cluster après transfert depuis holoSufA. Pratiquement, on mélange holoSufA et la SPL sous forme apo. Cette fois-ci les protéines ne sont pas séparées. Au bout d'un temps donné, un aliquot du mélange réactionnel est prélevé ; des solutions contenant le SpTpT, la SAM, du dithionite et du DTT y sont ajoutées, dans des proportions comme indiquées dans la partie Matériels et Méthodes et la réaction est poursuivie pendant une heure. On mesure ensuite l'activité enzymatique de la SPL par HPLC

comme décrit précédemment (Chandor *et al.*, 2006). Pendant ce temps d'incubation de 1 heure, il ne peut y avoir de transfert de holoSufA à la SPL puisque le centre [Fe-S] de SufA est instable à la réduction et est détruit lors de l'ajout de dithionite. La mesure de l'activité de la SPL renseigne donc sur l'efficacité du transfert qui correspond au temps de mélange initial des protéines SufA et SPL. Lors de cette expérience, il a tout de même été vérifié que holoSufA n'avait aucune capacité à transformer le substrat de la SPL, c'est-à-dire aucune activité SPL propre. Les analyses (figure II-5b) révèlent qu'après seulement 2 minutes d'incubation, l'activité de la Spore Photoproduit Lyase est maximale et correspond à 80 % de l'activité enzymatique enregistrée pour la Spore Photoproduit Lyase lorsque celle-ci est sous forme holo, reconstituée chimiquement. L'ensemble de ces résultats montre donc que la forme holoSufA obtenue après incubation avec du fer et du soufre inorganiques pendant 5 minutes est capable de transférer efficacement et rapidement ses centres [Fe-S] (mélange de 58 % de [4Fe-4S] et 4 % de [2Fe-S₂]) à la Spore Photoproduit Lyase.

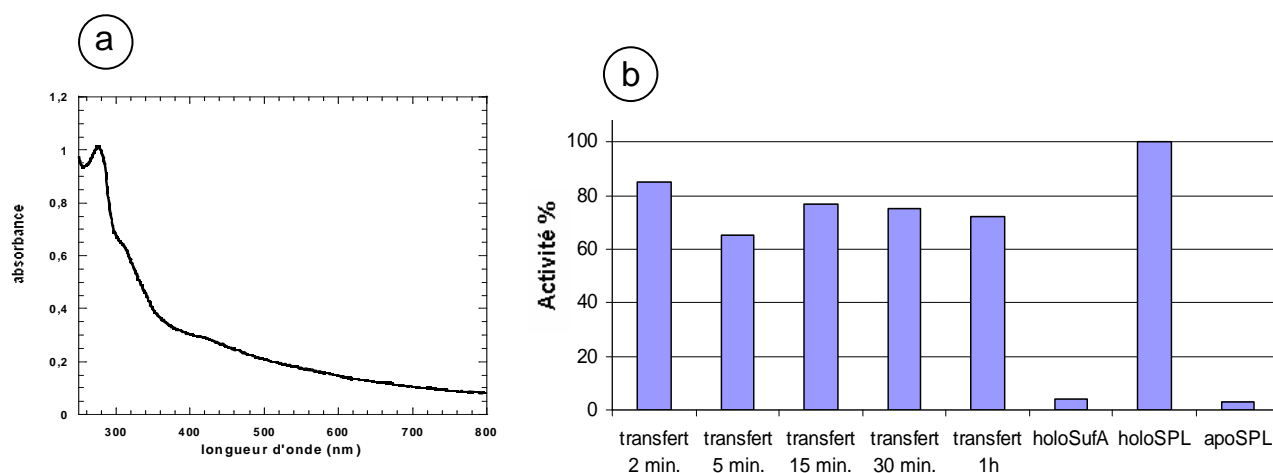


Figure II-5 : (a) spectre UV-visible de la SPL (30 µM) après 30 minutes d'incubation avec holoSufA puis séparation des protéines ; (b) graphe représentant l'activité de la SPL (en pourcentage par rapport à la SPL reconstituée prise comme référence) pour différents temps d'incubation avec holoSufA. Les valeurs données correspondent à une moyenne calculée à partir de deux séries d'expériences ; la marge d'erreur sur ces deux séries est de 5 %. L'activité de la SPL mesurée correspond à la quantité de produit (TpT) formé.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus montre qu'il est difficile d'établir de manière précise et définitive la nature des centres [Fe-S] assemblés dans SufA. En effet, on observe généralement un mélange de centres de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S] dont les proportions relatives varient selon les conditions expérimentales. Il faut noter que ces proportions peuvent également varier légèrement en fonction des préparations pour des

conditions expérimentales identiques. Il semble donc que SufA soit capable de coordonner des centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S], mais on ne peut toujours pas conclure s'il s'agit d'une propriété intrinsèque de la protéine ou si cela est dû aux conditions expérimentales *in vitro* ne reproduisant pas les conditions physiologiques. Toutefois, nos expériences ont permis d'apporter une information nouvelle : *in vitro*, la formation du cluster dans SufA est rapide, puisque après 5 minutes d'incubation de la protéine avec du fer et du soufre libres, on observe environ 65 % de centres [Fe-S] dans SufA, ce qui correspond à la quantité maximum de clusters que l'on ait pu observer lors des différentes expériences réalisées. De plus, on remarque qu'un temps de réaction court favorise la formation de centres de type [4Fe-4S] (je rappelle qu'après 5 minutes de réaction, SufA contient 58 % de centres [4Fe-4S] et 4 % de centres [2Fe-2S]). On peut alors se demander si les centres [2Fe-2S] ne seraient pas des produits de dégradation des centres [4Fe-4S]. Quoiqu'il en soit, la forme de SufA obtenue après 5 minutes de réaction est active : elle est capable de transférer ses centres [Fe-S] à différentes protéines cibles, et donc de maturer des protéines de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S].

II- Obtention d'une protéine SufA native métallée

Les expériences de reconstitution chimique nous ont montré que SufA contient après réaction 60 à 65 % de centres [Fe-S], correspondant à un mélange de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S], dont les proportions sont variables. Ainsi, elles ne nous ont pas permis de conclure de façon non ambiguë sur la nature du centre [Fe-S] assemblé dans SufA. Comme mentionné dans la Partie I, la caractérisation de la protéine SufA, à forte concentration, obtenue après purification en conditions aérobies, suggère fortement que la protéine contient des traces de centres [Fe-S] (entre 0,05 et 0,1 atome de fer et de soufre par monomère). C'est pourquoi, nous avons cherché à obtenir la protéine SufA métallée après purification en anaérobiose, et n'ayant subi aucun traitement chimique ultérieur, en espérant ainsi augmenter la quantité de fer et de soufre dans la protéine et déterminer la nature du centre [Fe-S].

II-1- Purification de SufA en conditions anaérobies

La protéine SufA est obtenue très majoritairement sous forme apo (de 0,05 à 0,1 atome de fer et de soufre par monomère) après purification en aérobiose. Comme cela a été

mentionné dans la partie I, il semble qu'elle perde son centre métallique lors des différentes étapes chromatographiques, celui-ci étant certainement dégradé par l'oxygène, puisqu'en effet, nous avons observé que l'exposition à l'air de la forme holo de SufA, reconstituée chimiquement, conduit à la dégradation du centre [Fe-S]. Nous avons donc reproduit la purification de SufA en conditions anaérobies ($O_2 < 4$ ppm, $18^\circ C$) espérant augmenter la quantité de fer et de soufre dans la protéine. Dans ce cas, la culture bactérienne est réalisée en aérobiose ; l'extraction des protéines solubles ainsi que la purification se poursuivent en boîte à gants. La purification se déroule de manière similaire, en utilisant une colonne d'affinité NiNTA suivie d'une colonne d'exclusion stérique Superdex-75 (cf Partie I) : on observe la formation d'un anneau rouge sur la partie supérieure du gel lors du chargement des extraits sur la colonne Ni-NTA ; cependant, la solution protéique récupérée après la deuxième étape chromatographique est incolore à faible concentration (de l'ordre de 10 mg/mL). Le spectre UV-visible correspondant ne contient pas de bande d'absorption marquée entre 300 nm et 450 nm, pouvant indiquer la présence d'un centre métallique dans la protéine. Les dosages colorimétriques révèlent que la protéine ne contient pas plus de 0,1 à 0,2 atome de fer et de soufre par chaîne polypeptidique.

Nous avons alors répété l'expérience, en modifiant les conditions expérimentales, en ajoutant du fer, au moment de l'induction (citrate de fer 100 μM), dans les milieux de culture. Tout d'abord, on n'observe pas de changement de couleur des culots cellulaires récupérés après centrifugation des milieux de culture : ils ne sont que très légèrement rosés. D'autre part, les rendements en fer et en soufre ne sont pas meilleurs que lors de l'expérience précédente.

Ainsi, la purification de SufA en anaérobiose ne conduit pas à une augmentation significative et satisfaisante de la quantité de fer et de soufre dans la protéine, permettant de définir la nature du centre [Fe-S].

II-2- Purification de SufA en présence de l'opéron *isc*

Disposant au laboratoire d'un plasmide codant pour l'ensemble de l'opéron *isc* d'*E. coli*, nous avons cherché à produire la protéine SufA en présence de la machinerie de biosynthèse ISC.

Nous avons transformé une souche *E. coli* BL21(DE3), contenant déjà le plasmide codant pour les protéines ISC et résistant à la tétracycline, avec le plasmide pET-SufA_{STOP},

résistant à l'ampicilline et codant pour la protéine SufA ne contenant pas d'étiquette polyhistidine. Après sonication des cellules en conditions anaérobies, les extraits protéiques obtenus ne sont pas plus colorés que lors d'expériences précédentes, lorsque la culture était réalisée en absence du système ISC, ce qui ne suggère pas d'ores et déjà d'amélioration significative du contenu en fer et soufre dans SufA. La purification est ensuite réalisée selon le même mode opératoire que celui décrit pour SufA_{STOP} seule. Dans ces conditions, la protéine SufA pure, est quasiment sous forme apo (0,06 fer/monomère, soufre non détecté).

Ce protocole ne permet donc pas non plus l'obtention d'une protéine SufA métallée.

II-3- Obtention de la protéine SufA purifiée à partir d'un plasmide codant pour l'ensemble de l'opéron *suf*

Ce projet a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Wayne Outten (Department of Chemistry and Biochemistry, University of South Carolina, Columbia). Son équipe de recherche a construit un plasmide, pGSO 164 SufD_H128A, qui code pour les six protéines de l'opéron *suf* et où une mutation dans le gène *sufD* a été introduite.

II-3-1- Transformation et surexpression

Le plasmide pGSO 164 SufD_H128A a servi à transformer la souche *E. coli* Top10. Une colonie isolée, parmi les transformants sélectionnés sur un milieu LB-agar contenant de l'ampicilline, a été utilisée pour inoculer 100 mL de milieu LB/ampicilline. La culture d'un volume final de 2 L a été effectuée comme décrit dans Matériels et Méthodes. La surexpression des protéines est induite par l'ajout d'arabinose 0,2 %. Après 3 heures d'induction, les culots bactériens ont été récupérés par centrifugation. Ils présentent une coloration marron foncé.

II-3-2- Purification de SufA

La lyse cellulaire, réalisée par des cycles de congélation-décongélation des cellules, ainsi que la purification de SufA, sont effectuées en conditions anaérobies. SufA est purifiée en une seule étape chromatographique, sur une colonne échangeuse d'anions Q-sépharose. Environ 10 mg de SufA (pureté : 90 %) sont obtenus à partir de 2 L de culture. La solution protéique, à une concentration de 10 mg/mL, est rose/rouge.



Figure II-6 : gel de polyacrylamide 15 % en conditions dénaturantes présentant l'état de pureté de la protéine SufA après purification.

II-3-3- Caractérisation biochimique et spectroscopique

Quantification du fer et du soufre

Le contenu en fer et en soufre dans la protéine SufA obtenue après purification a été déterminé comme décrit dans Matériels et Méthodes. SufA contient 0,32 fer/monomère et 0,34 soufre/monomère. Le fait que le fer et le soufre soient présents en quantités stoechiométriques suggère fortement qu'ils sont assemblés sous forme de cluster [Fe-S] au sein de SufA.

Spectroscopie d'absorption UV-visible

Un spectre UV-visible de la préparation de SufA a été enregistré en anaérobiose (figure II-7). Il présente une bande de transfert de charge $S \rightarrow Fe(III)$ située vers 420 nm ainsi qu'une bande d'absorption vers 320 nm. Ces caractéristiques sont compatibles avec la présence d'un centre [Fe-S], plutôt de type [2Fe-2S], au sein de la protéine.

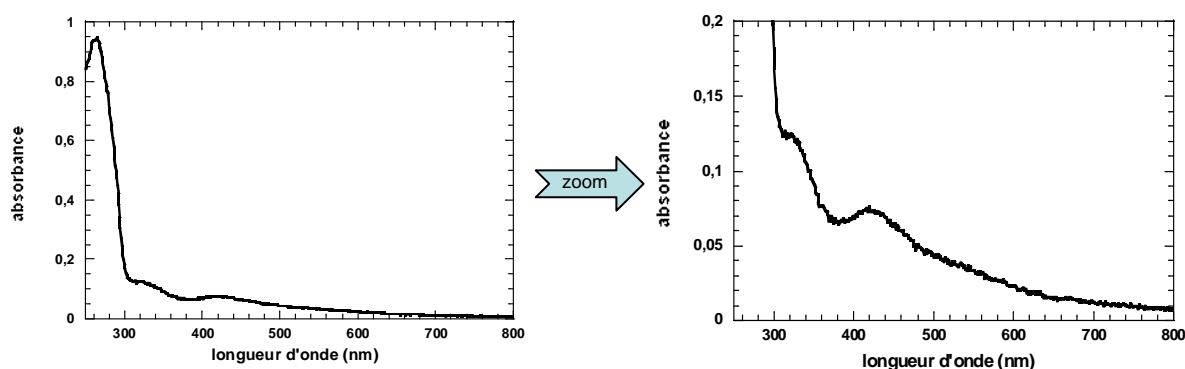


Figure II-7 : spectre UV-visible de SufA (70 μ M) obtenue après purification en anaérobiose à partir du plasmide pGSO 164 SufD_H128A codant pour l'ensemble de l'opéron *suf*, enregistré dans une cuve de 1 cm de trajet optique.

II-3-4- Spectroscopie Mössbauer

Nos analyses suggèrent que SufA contient un centre [Fe-S]. Afin de déterminer la nature de ce centre ([2Fe-2S] ou [4Fe-4S]), nous avons entrepris une étude par spectroscopie Mössbauer. Celle-ci a été réalisée par Vincent Huynh (Department of Physics – Emory University - Atlanta). Pour ces analyses, la culture de bactéries a été effectuée en milieu minimum, en présence de ^{57}Fe , élément nécessaire pour la détection des centres [Fe-S] et des espèces contenant du fer en général, en spectroscopie Mössbauer. Le protocole de purification reste le même. La protéine SufA pure ainsi obtenue a été congelée en boîte à gants et analysée par spectroscopie Mössbauer. Le spectre Mössbauer, enregistré à 4,2 K, est présenté figure II-8. Il contient un doublet très largement majoritaire, dont les paramètres sont caractéristiques d'un centre [2Fe-2S]. Il représente 90 % du fer présent dans l'échantillon. Le reste du fer (10 %) correspond à du fer ferreux coordonné par des atomes d'azote et d'oxygène.

Ainsi, le spectre Mössbauer obtenu indique sans ambiguïté que le centre [Fe-S] présent dans SufA après purification est de type [2Fe-2S]. Nous n'observons pas, dans ces conditions, de mélange de centres [Fe-S].

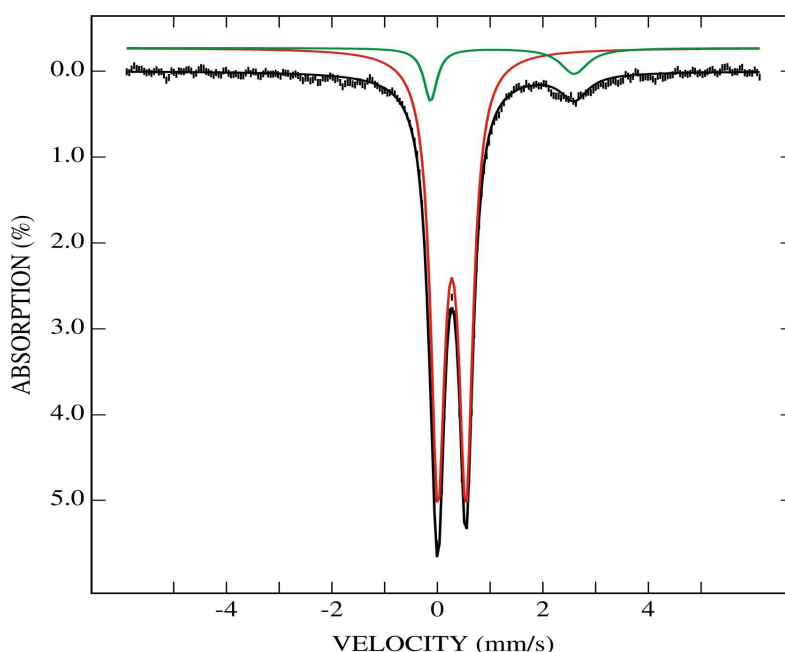


Figure II-8 : spectre Mössbauer de la protéine SufA obtenue après purification en anaérobiose à partir de tout l'opéron *suf*, enregistré à 4,2 K et sous un champ magnétique extérieur de 50 mT.

II-3-5- Spectroscopie Raman

Des analyses de spectroscopie Raman de résonance ont également été entreprises. Celles-ci ont été réalisées par Luc Bordes du laboratoire des Protéines Transductrices d'Energie au CEA-Saclay. L'échantillon de SufA, purifié en anaérobiose, a été concentré à 3 mM, afin d'avoir une concentration en fer de 960 μM , nécessaire pour ce type de spectroscopie. Une goutte de 20 μL a alors été congelée en boîte à gants sur le support Raman et analysée par spectroscopie Raman. Les résultats préliminaires obtenus pour la protéine SufA après purification sont présentés en figure II-9. Le spectre de diffusion Raman de résonance de SufA, excitée à 496 nm, a été enregistré entre 200 et 450 cm^{-1} . On remarque que le spectre est mal défini ; les signaux ne sont pas très intenses. Malgré l'accumulation, nous n'avons pas obtenu de meilleur signal ; ceci est dû, entre autres, à la fluorescence importante de la protéine. On observe tout de même une bande de vibration bien marquée à 278 cm^{-1} , une autre à 290 cm^{-1} , ainsi qu'un massif autour de 350 cm^{-1} . Or, il est connu que les centres [2Fe-2S] présentent une bande de vibration caractéristique située entre 280 cm^{-1} et 290 cm^{-1} . Les autres types de centres ne présentent pas cette bande de vibration. Les centres [2Fe-2S] sont également, en général, caractérisés par des bandes de vibration vers 330 cm^{-1} , 350 cm^{-1} et 400 cm^{-1} . Pour référence, des spectres Raman de centre [2Fe-2S] et [4Fe-4S] sont représentés figure II-10. Dans notre cas, il est difficile d'identifier précisément ces bandes de vibration, mais on peut en deviner, situées dans le massif entre 330 et 390 cm^{-1} . Ainsi, le spectre Raman tend plutôt à confirmer les résultats obtenus par spectroscopie Mössbauer : SufA semble contenir un centre de type [2Fe-2S].

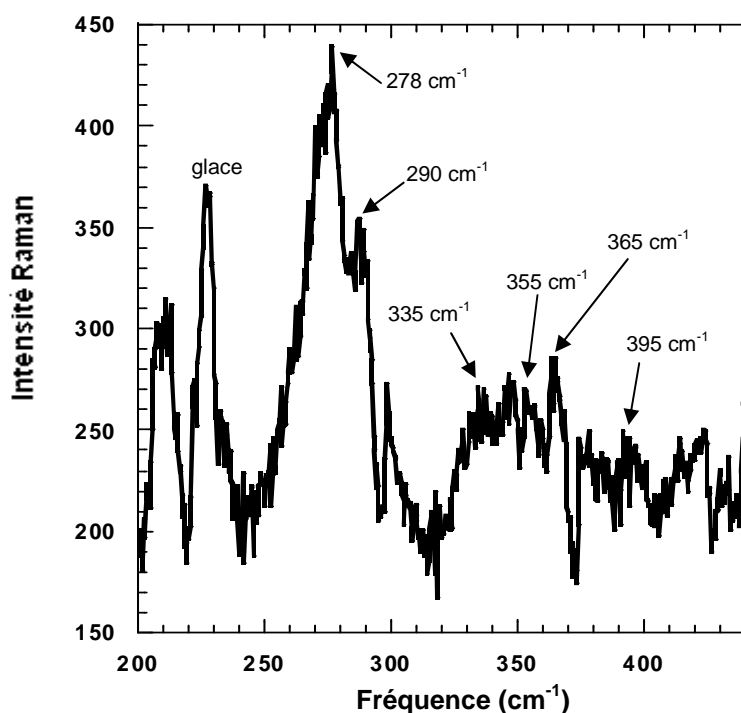


Figure II-9 : Spectre Raman de résonance de SufA (3 mM). La température d'enregistrement est de 77 K, la longueur d'onde d'excitation de 496 nm et la puissance de 10 mW.

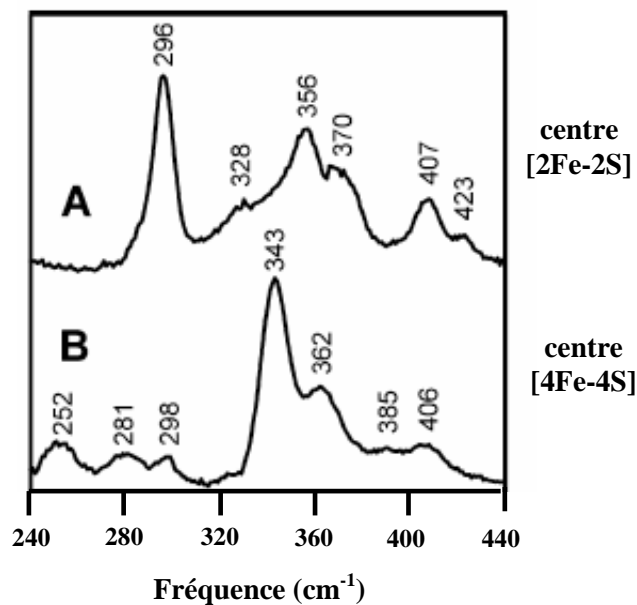


Figure II-10 : spectres Raman de résonance de IscU contenant un centre [2Fe-2S] (spectre A) et un centre [4Fe-4S] (spectre B) (Chandramouli *et al.*, 2007)

II-3-6- Etude de la maturation de la Fdx à partir de SufA

L'ensemble des expériences réalisées suggère fortement que SufA contient un centre [Fe-S]. Afin de valider cette hypothèse, ainsi que celle selon laquelle SufA est une protéine scaffold, nous avons étudié la réaction de transfert du centre [Fe-S] de SufA isolée en anaérobiose, à la ferrédoxine (Fdx). Ainsi, la ferrédoxine sous forme apo, prétraitée au DTT, a été incubée avec SufA purifiée, en conditions anaérobies, les quantités de SufA introduites permettant d'apporter un excès de fer et de soufre d'environ 1,5 par rapport à la ferrédoxine. Ceci correspond donc à un léger défaut de fer et de soufre par rapport au contenu optimal de fer et de soufre pour la ferrédoxine puisque celle-ci accepte un centre $[2\text{Fe-2S}]$ par monomère. La réaction est suivie en fonction du temps par spectroscopie UV-visible. On observe que le spectre UV-visible du mélange apoFdx/SufA évolue au cours du temps : des bandes d'absorption à 415 nm et 460 nm, caractéristiques du centre $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ de la ferrédoxine apparaissent dès 15 minutes. Après 2h30 d'incubation, on obtient le spectre présenté figure II-10 (trace continue). L'échantillon est ensuite réduit avec un excès de dithionite. En spectroscopie UV-visible, on observe une forte diminution des bandes à 415 nm et 460 nm, ainsi que l'apparition d'une bande à 550 nm (figure II-10, trace en pointillé), caractéristique de la présence du centre à l'état réduit $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ de la ferrédoxine. L'échantillon est alors congelé, puis analysé par spectroscopie RPE. Un signal RPE, de spin $S = 1/2$ et centré autour de $g = 2$ est observé. Les valeurs de g sont identiques à celles obtenues figure II-4 b. Tout ceci est caractéristique du centre $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ de la ferrédoxine et nous confirme d'ores et déjà que le transfert du centre [Fe-S] de SufA a bien eu lieu et que le centre $[2\text{Fe-2S}]$ est bien agencé au sein de la ferrédoxine. La quantification du signal RPE, dans des conditions non saturantes, par comparaison avec une solution standard de CuEDTA (1 mM) révèle que la ferrédoxine contient, dans ce cas, une quantité de centres $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ similaire à celle obtenue lorsque la réaction de transfert est effectuée à partir de SufA reconstituée chimiquement (c'est-à-dire environ 60 % du fer total).

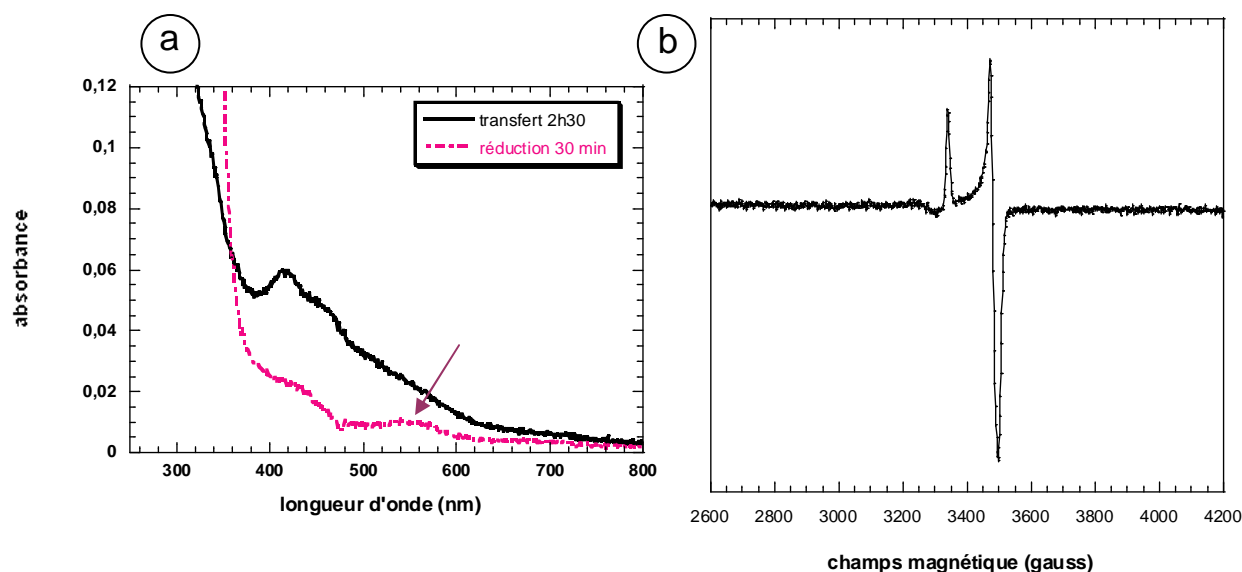


Figure II-10 : (a) spectre UV-visible du mélange SufA/Fdx après 2h30 de réaction (ligne continue), puis après 2h30 de réaction et réduction au dithionite (ligne en pointillé), (b) spectre RPE correspondant, les conditions d'enregistrement étant : température 10 K, puissance 0,1 mW, gain 2.10^4 , modulation d'amplitude 10 G

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus montre que SufA, obtenue après purification en anaérobiose, contient un centre [Fe-S] et que celui-ci est transférable à la ferrédoxine, sans ajout d'un quelconque élément dans le milieu réactionnel. Ce résultat est d'une grande importance puisqu'il valide notre hypothèse selon laquelle SufA est une protéine [Fe-S] scaffold.

Discussion

Comme déjà mentionné, les protéines de type A et de type U ont été définies, par plusieurs équipes, comme des protéines scaffold : elles possèdent toutes trois résidus cystéines largement conservés organisés selon un motif consensus caractéristique ($CX_{63}CGC$ pour les type A et CX_nCX_pC pour les types U) et proposés comme étant les ligands d'un centre [Fe-S] ; de plus, il a été montré, *in vitro*, que toutes ces protéines étaient capables d'assembler des centres [Fe-S] et de les transférer à des protéines cibles, de type [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] (Nishio and Nakai, 2000; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004; Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003; Unciuleac *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2002b).

Dans le cas de SufA d'*E. coli*, il a précédemment été décrit que la protéine contient après reconstitution chimique, réalisée sur 3 heures avec 4 excès de fer et de soufre, un mélange de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S], et que cette préparation peut transférer ses centres [Fe-S] à une protéine cible (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2004).

Nous avons fait varier les conditions de reconstitution, et avons observé, à l'aide de techniques spectroscopiques (UV-visible et Mössbauer) et biochimiques (dosages colorimétriques) que :

(1) la protéine contient toujours, *in vitro*, un mélange de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] dont la quantité correspond au maximum à 67 % du fer total. Les proportions de ces deux types de centres varient suivant les conditions expérimentales et les préparations. Nous n'avons pas pu déterminer si cela correspondait à une propriété intrinsèque de la protéine qui serait donc capable d'assembler à la fois des centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] ou si cela correspondait à un artefact dû aux conditions expérimentales de reconstitution ne reproduisant pas les conditions physiologiques.

(2) après 5 minutes seulement d'incubation avec 2 excès de fer et de soufre, SufA contient déjà le maximum de centres [Fe-S] (62 %). Ces centres sont transférables à des protéines cibles de natures différentes (protéines [2Fe-2S] comme la ferrédoxine ou protéines [4Fe-4S] comme la Spore Photoproduct Lyase). Ainsi, l'assemblage du centre [Fe-S] par reconstitution chimique est un processus rapide. De part ces études, nous avons montré qu'il n'est pas nécessaire d'attendre plusieurs heures pour former un centre [Fe-S] au sein de SufA.

En conclusion, nos expériences réalisées *in vitro* montrent que SufA assemble rapidement un mélange de centres [Fe-S], ceux-ci étant transférables. Afin de déterminer si les conditions de reconstitution chimique reflètent les conditions physiologiques, nous avons purifié la protéine SufA en anaérobiose, l'objectif étant d'obtenir la protéine native métallée n'ayant subi aucun traitement chimique. Ceci constituait un enjeu de taille compte tenu de la grande instabilité du cluster dans SufA lors de la purification (voir partie I, chapitre I).

Nous avons testé différents protocoles de purification. La reproduction du protocole de purification de SufA seule en anaérobiose ne permet pratiquement aucune amélioration par rapport aux résultats obtenus en conditions aérobies. De plus, lorsque SufA est purifiée en présence de tout l'opéron *isc*, elle est obtenue sous forme apo. Toutefois, dans ce cas, il faut noter que le régulateur IscA est présent et peut limiter l'assemblage des centres [Fe-S] au sein des protéines scaffold et notamment SufA. Les meilleurs résultats ont été alors obtenus en purifiant SufA à partir de tout l'opéron *suf*. Dans ces conditions, elle contient, après

purification, des quantités stoechiométriques de fer et de soufre (0,4 atome de fer et de soufre). Cette valeur est, il est vrai, assez faible et on peut s'interroger sur sa signification physiologique. Selon notre hypothèse, cela indique que l'échantillon analysé est constitué de protéines apo et de protéines ayant un centre [Fe-S]. D'autre part, le spectre UV-visible de la protéine purifiée comporte des bandes d'absorption à 320 nm et 420 nm, indiquant la présence d'un centre [Fe-S] dans la protéine, plutôt de type [2Fe-2S]. Ceci a été confirmé par les analyses de spectroscopie Mössbauer qui indiquent que 90 % du fer présent dans l'échantillon est présent sous forme de centre [2Fe-2S]. Ces résultats s'accordent avec les résultats préliminaires obtenus par spectroscopie Raman de résonance. En effet, le spectre Raman de SufA après purification, bien qu'assez mal défini, contient une bande de résonance intense à 280 cm^{-1} et 290 cm^{-1} , caractéristique de centres [2Fe-2S]. Les centres [4Fe-4S] ne possèdent pas cette bande. Ainsi, l'observation d'une stoechiométrie entre le fer et le soufre, ainsi que les informations fournies par les spectres UV-visible et Mössbauer suggèrent fortement que SufA contient un centre [Fe-S], de type [2Fe-2S] après purification. De toute évidence, nous disposons, avec SufA, d'une protéine de type A supplémentaire isolée à l'état natif avec un centre [Fe-S].

En effet, à ce jour trois protéines de type A ont pu être isolées, *in vivo*, sous forme métallée. En 2002, Morimoto et coll. ont montré que IscA de *Synechocystis*, SLR 1565, coordine un centre [2Fe-2S], dont le spectre UV-visible est représenté ci-dessous (Morimoto *et al.*, 2002).

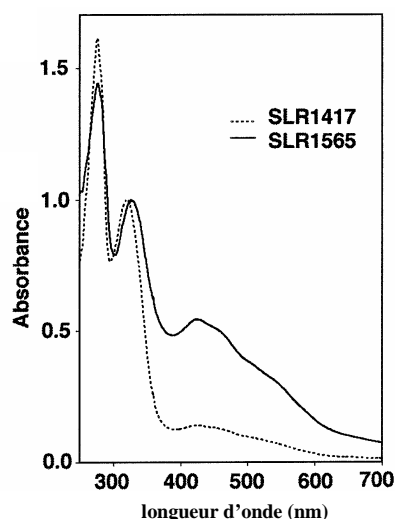


Figure II-11 : spectres UV-visible des deux protéines de *Synechocystis* homologues à IscA, obtenus après purification (Morimoto *et al.*, 2002)

Plus récemment, en 2006, Nakai et coll. ont montré en résolvant la structure cristallographique de la protéine native IscA de *T. elongatus* que cette protéine contient un centre [2Fe-2S] par dimère, celui-ci étant coordonné, de façon inattendue, par trois cystéines d'un monomère et une cystéine de l'autre monomère (Morimoto *et al.*, 2006).

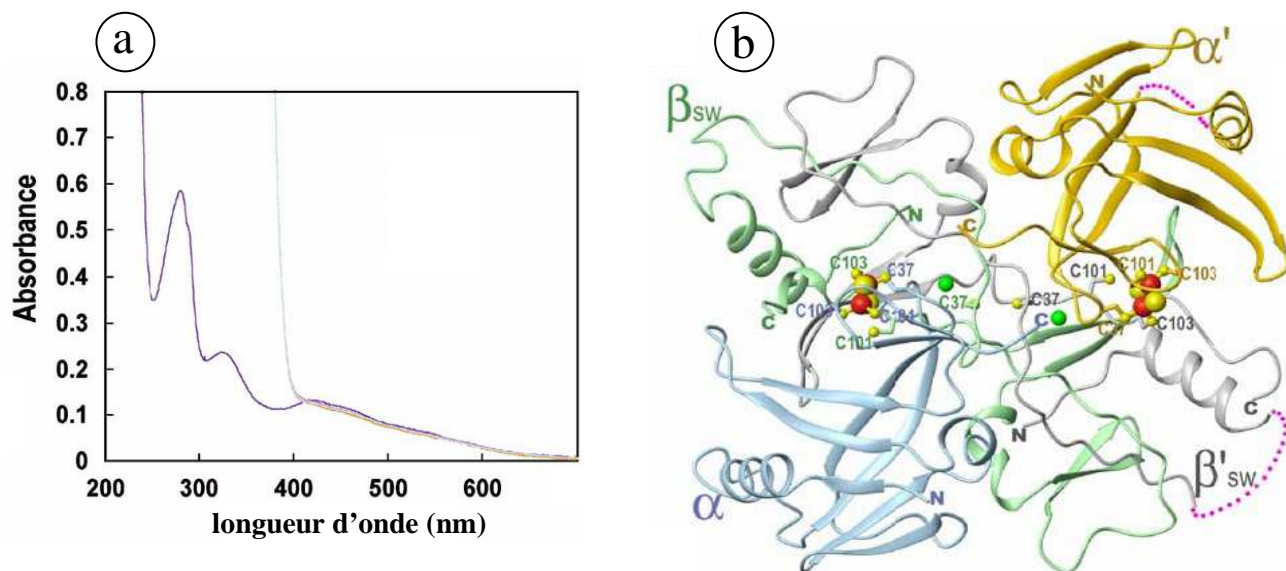


Figure II-12 : (a) spectre UV-visible (trace violette) de la protéine native IscA de *T. elongatus* ; (b) structure cristallographique de IscA de *T. elongatus*, liant deux centres [2Fe-2S] par tétramère (Morimoto *et al.*, 2006)

Enfin, Qiu et coll. ont réussi à isoler, après purification, la protéine IscA de *A. ferrooxidans* métallée. Elle contient un centre [4Fe-4S] stable, caractérisé par le spectre UV-visible ci-dessous (Zeng *et al.*, 2007).

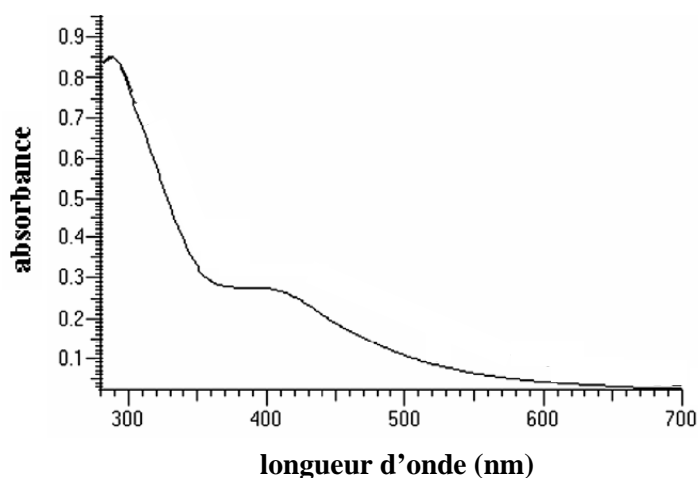


Figure II-13 : spectre UV-visible de IscA d'*A. ferrooxidans* après purification (Zeng *et al.*, 2007)

Ainsi, plusieurs protéines de type A ont pu être isolées coordonnant un centre [Fe-S] à l'état natif. On peut noter, après comparaison de ces résultats, que la nature du centre [Fe-S] semble être propre à une protéine donnée puisque certaines ont été obtenues avec des centres [2Fe-2S] (cas de IscA de *T. elongatus*, de IscA de *Synechocystis* et SufA d'*E. coli* ?) et une autre avec un centre de type [4Fe-4S] (cas de IscA de *A. ferrooxidans*). Quoiqu'il en soit, tous ces exemples tendent à montrer que les protéines de type A sont des protéines [Fe-S]. Dans ce contexte, il est à noter qu'aucune protéine de type A n'a été isolée après purification qu'avec du fer et dépourvue de soufre. Ceci remet en question le rôle des protéines de type A comme donneur de fer *in vivo*. Ainsi, les résultats obtenus par Ding et coll., dans des conditions *in vitro*, montrant que IscA intervient comme donneur de fer dans la biosynthèse des centres [Fe-S], semblent peu probables.

Enfin, comme nous l'avons déjà souligné, la protéine SufA isolée *in vivo* possède un centre [Fe-S]. Ce centre, même obtenu en proportion faible (0,4 atomes de fer et de soufre par monomère) est transférable à la ferrédoxine, avec un bon rendement, identique à celui obtenu à partir d'une protéine reconstituée chimiquement. L'ensemble de ces données nous permet de conclure quant à la fonction de la protéine SufA d'*E. coli* : SufA est une protéine scaffold.

Nous n'avons pas testé le transfert du centre [Fe-S] de SufA à une protéine de type [4Fe-4S] comme la Spore Photoproduit Lyase par exemple. On peut penser que ce transfert est possible, après recombinaison de deux centres [2Fe-2S] pour former un centre [4Fe-4S], comme cela a été montré dans le cas de IscU pour le transfert du cluster à l'aconitase (Unciuleac *et al.*, 2007). Cette étape nécessite, il est vrai, un apport d'électrons, ce qui peut être réalisé par la ferrédoxine dans le cas de IscU (Unciuleac *et al.*, 2007). D'autre part, il aurait été intéressant d'étudier la cinétique de transfert pour mettre en évidence d'éventuelles différences entre le transfert à une protéine de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S].

On peut également s'interroger sur la maturation des protéines de type [3Fe-4S] de manière générale. Aucune protéine scaffold n'a été isolée avec un centre [3Fe-4S], que ce soit après purification, ou après reconstitution chimique. Elles doivent pourtant être capables de maturer des protéines cibles de type [3Fe-4S]. Dans ce cas, le réarrangement du cluster (pour obtenir un cluster [3Fe-4S]) se fait-il au sein de la protéine scaffold ou bien lors du transfert à la protéine cible ? Nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucun élément pour répondre à cette question qui a été très peu abordée dans la littérature.

Il a été observé que, *in vivo*, l'inactivation des protéines de type A n'avait que peu d'effet sur la biosynthèse des centres [Fe-S] : aucun phénotype marqué, indiquant par exemple une diminution de l'activité des enzymes [Fe-S], n'a été mis en évidence. On peut donc se poser la question de la nécessité de ces protéines en tant que protéine scaffold, si ce n'est celle de servir d'usine d'assemblage de centres [Fe-S] secondaire, le rôle premier étant réservé à la protéine IscU. En fait, plusieurs expériences tendent à montrer que les protéines de type A interviennent en tant que protéine scaffold mais dans des conditions spécifiques.

En effet, il a été montré que IscA joue un rôle prédominant en présence de forts taux d'oxygène chez *A. vinelandii* : l'inactivation de *iscA* empêche la croissance des cellules lorsque celles-ci sont soumises à des taux élevés d'oxygène (40 %). Dean et coll. ont alors proposé que IscA pourrait intervenir spécifiquement dans la maturation des protéines [Fe-S] en présence de quantités élevées d'oxygène ou dans la réparation de centres [Fe-S] ayant subi un dommage oxydatif (Johnson *et al.*, 2006).

D'autre part, SufA aurait un rôle clé dans la virulence d'éléments pathogènes tels que *E. chrysanthemi* (Nachin *et al.*, 2003). De fait, l'infection d'une cellule hôte par un élément pathogène provoque des conditions de stress (carence en fer et stress oxydant) que subissent les éléments pathogènes, qui doivent donc utiliser le système SUF (et donc SufA) spécialement adapté à ces conditions.

Enfin, le gène *erpA* (Essential Respiratory Protein), codant pour une autre protéine de type A, est un gène essentiel d'*E. coli* pour la respiration aérobie et anaérobie. En effet, des études récentes réalisées par le laboratoire de F. Barras, auquel notre laboratoire a été associé pour les études biochimiques et spectroscopiques, ont montré que la protéine ErpA était essentielle pour la croissance des cellules d'*E. coli* en présence d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons. Des études plus poussées ont montré que la protéine ErpA était impliquée dans la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (Loiseau *et al.* sous presse).

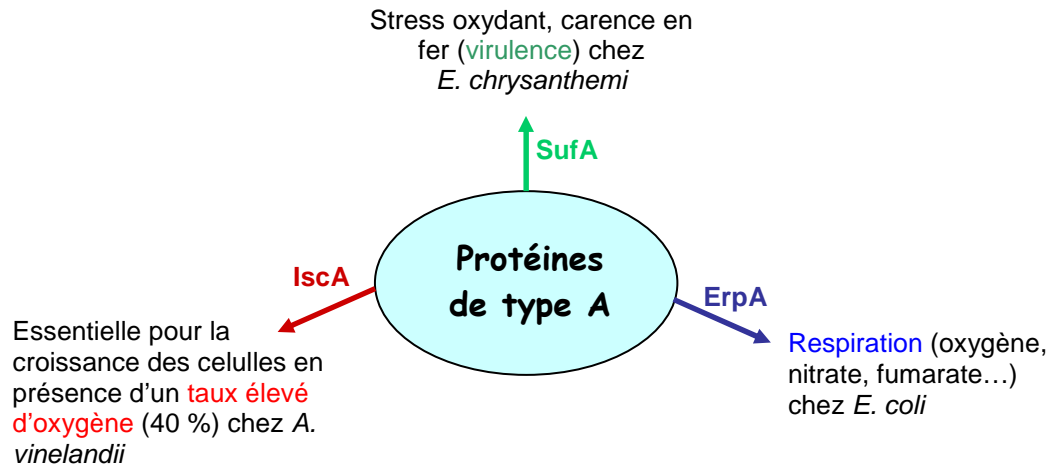


Figure II-14 : schéma résumant les conditions spécifiques dans lesquelles les protéines de type A interviennent.

Partie III

Etude de la nature des ligands du centre [Fe-S] dans SufA

Introduction

Ayant démontré que la protéine SufA est une protéine scaffold capable d'assembler transitoirement des centres [Fe-S] (voir chapitre précédent), nous avons cherché à déterminer précisément la nature des ligands de ces clusters. Comme mentionné en introduction, les protéines de type A possèdent trois résidus cystéines largement conservés (CX₆₃CGC) et proposés comme étant les ligands des centres [Fe-S] (Krebs *et al.*, 2001; Wollenberg *et al.*, 2003). Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent par différentes équipes sont parfois contradictoires et ne permettent pas de conclure précisément quant au rôle exact des cystéines dans la coordination du cluster.

Nous avons cherché à identifier les cystéines nécessaires à la coordination du cluster dans SufA d'*E. coli*, dans des conditions *in vitro*. Pour cela, nous avons caractérisé biochimiquement et spectroscopiquement les trois mutants simples Cys→Ser de SufA d'*E. coli* après reconstitution chimique et étudié leur capacité à transférer des centres [Fe-S] à une protéine cible. D'autre part, des études préliminaires par RMN ont été réalisées au laboratoire sur la forme holo de SufA (obtenue après reconstitution chimique) et sont présentées brièvement à la fin de ce chapitre.

I- Purification des protéines mutées

La purification des protéines mutantes a été décrite dans la Partie I, page 84. Je rappelle que les trois protéines SufA_{C50S}, SufA_{C114S} et SufA_{C116S} possèdent une étiquette polyhistidine en C-terminal et sont purifiées aisément sur colonne d'affinité NiNTA suivie d'une colonne Superdex-75. Chacune des protéines est obtenue pure (pureté > 95 %) avec un bon rendement (environ 7 mg pour 1 L de culture).

Des dosages révèlent que ces protéines sont obtenues sous forme apo : seules des traces de fer et de soufre sont détectées (moins de 0,05 atome de fer et de soufre par monomère).

II- Reconstitution chimique de chaque simple mutant Cys→Ser

Les protéines SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} ont été reconstituées chimiquement, avec 4 excès molaires de fer et de soufre pendant 3 heures, comme cela a été décrit dans la Partie II pour la protéine sauvage. A l'issue de cette reconstitution, on remarque que chaque simple mutant fixe des quantités de fer comparables à celles dosées dans le cas de la protéine sauvage (valeurs comprises entre 1,4 et 2,5 fer/monomère). Nous avons également fait varier les conditions expérimentales lors de la reconstitution chimique. On remarque alors que le fait d'incuber les protéines mutées dans un mélange contenant des quantités plus ou moins importantes de fer et de soufre inorganiques (de 2 à 6 excès molaires par rapport à SufA), ou de prolonger ou diminuer le temps d'incubation (de 5 minutes à 4 heures), n'influe pas sur la quantité de fer et de soufre incorporée dans ces protéines. Ce premier résultat est décevant dans la mesure où l'on ne peut faire aucune conclusion quant à l'importance des trois résidus cystéines de SufA dans la coordination des centres [Fe-S].

II-1- Caractérisation par spectroscopie UV-visible

Des spectres UV-visible des protéines SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} ont été enregistrés en anaérobiose entre 250 nm et 800 nm (figure III-1). Dans chaque cas, on observe une bande de transfert de charge S→Fe(III) située vers 420 nm ainsi qu'un épaulement vers 320 nm. Ces caractéristiques sont compatibles avec la présence d'un centre [Fe-S] au sein de la protéine. Toutefois, on peut remarquer que sur les spectres UV-visible des protéines SufA_{C114S} et plus particulièrement SufA_{C116S}, les bandes d'absorption sont un peu moins marquées que dans le cas de la protéine sauvage. En fait, on peut remarquer que le comportement du mutant SufA_{C116S} est assez étrange : la protéine contient la même quantité de fer et de soufre que la protéine sauvage, mais le spectre UV-visible est différent ; les bandes d'absorption à 320 nm et 420 nm sont moins bien définies, comme si la protéine contenait peu de centres [Fe-S]. Peut-être contient-elle plus de fer non spécifique que les autres protéines ? Enfin, il faut noter qu'un léger épaulement vers 600 nm est souvent présent sur les spectres de chaque simple mutant, pouvant indiquer la présence de centres [Fe-S] non spécifiques ou polysulfures non spécifiques (Leal *et al.*, 2004).

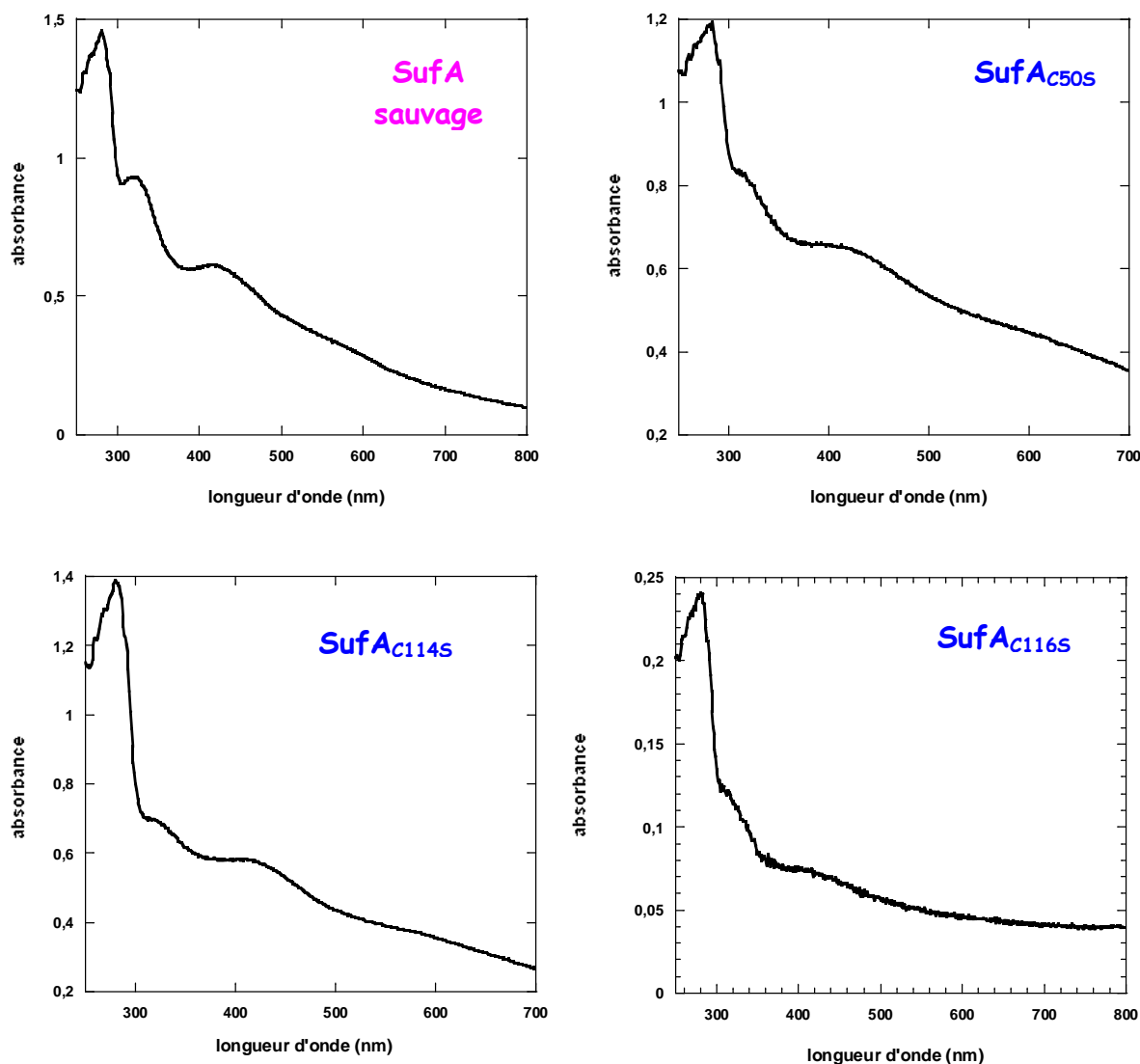


Figure III-1 : spectres UV-visible des protéines SufA_{C50S} (110 μ M), SufA_{C114S} (120 μ M) et SufA_{C116S} (17 μ M) obtenues après reconstitution chimique puis dessalage (conditions utilisées ici : 4 excès molaires de fer et de soufre inorganiques, temps d'incubation 3 heures). Le spectre obtenu pour la protéine SufA sauvage (125 μ M) dans les mêmes conditions est représenté pour comparaison.

II-2- Spectroscopie Mössbauer

Le spectre UV-visible n'étant pas suffisant pour conclure quant à la présence d'un centre [Fe-S] spécifique dans les protéines, les protéines SufA_{C50S} et SufA_{C114S} reconstituées chimiquement ont été analysées par spectroscopie Mössbauer afin de déterminer la nature du fer fixé dans l'échantillon et de quantifier les différentes espèces présentes. L'expérience n'a pas été réalisée avec la protéine SufA_{C116S}.

Les protéines SufA_{C50S} et SufA_{C114S} ont été reconstituées avec 2 excès molaires de $^{57}\text{Fe}^{2+}$ et de S^{2-} , pendant 5 minutes à 18°C, comme cela a été réalisé avec la protéine sauvage et décrit dans le chapitre précédent. Les spectres Mössbauer, enregistrés à 105 K, sont présentés en figure III-2. Ces spectres sont comparables entre eux. Ils sont composés de quatre doublets. Les doublets I et II correspondent à du Fe(II) coordonné par des atomes d'azote ou d'oxygène. Le doublet III indique la présence d'une petite quantité de Fe(II) coordonné par des atomes de soufre. Enfin, le doublet IV correspond à des centres de type $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ dont les proportions varient suivant les échantillons (tableaux III-1 et III-2) ; toutefois ces proportions restent du même ordre de grandeur que celles observées dans le cas de la protéine sauvage (autour de 40 %). On n'observe pas de centres $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ dans ces échantillons.

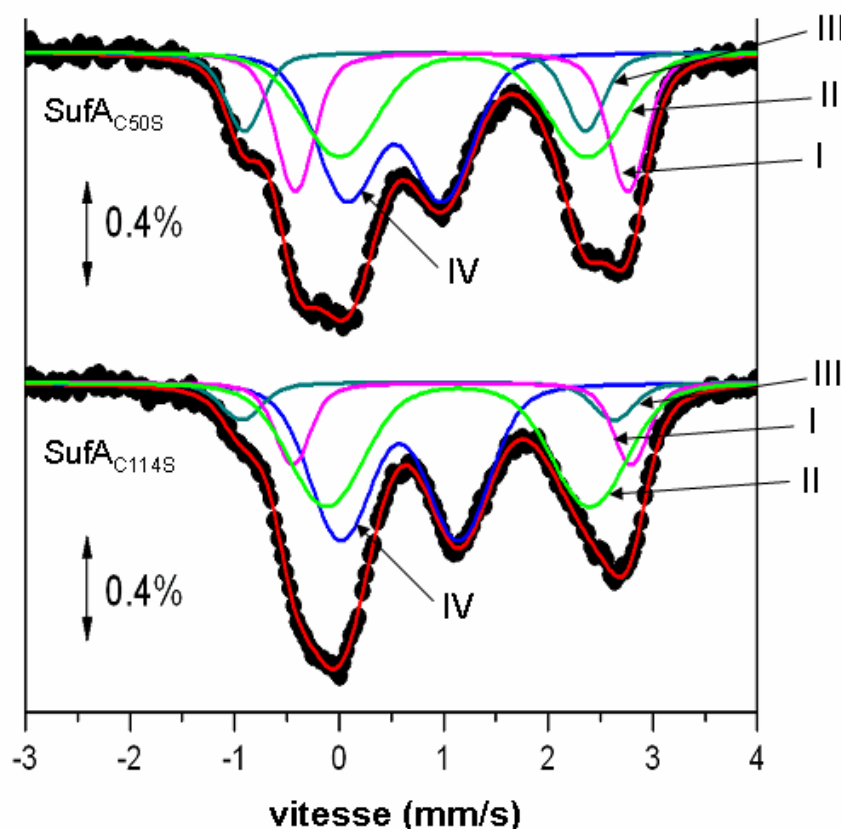


Figure III-2 : spectres Mössbauer, enregistrés à 105 K, des protéines SufA_{C50S} (1,1 mM, 1,9 fer/monomère) et SufA_{C114S} (870 μM , 2,2 fer/monomère) reconstituées chimiquement avec 2 excès de $^{57}\text{Fe}^{2+}$ et S^{2-} , pendant 5 minutes puis dessalage.

Doublet	Attribution	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire (%)
I	Fe ²⁺ - octaédrique Ligands N/O	1,17	3,18	23
II	Fe ²⁺ - octaédrique Ligands N/O	1,19	2,37	31
III	Fe ²⁺ - tétraédrique Ligands S	0,73	3,26	13
IV	[4Fe-4S] ²⁺	0,53	0,81	36

Tableau III-1 : Paramètres Mössbauer des doublets constituant le spectre correspondant à la protéine SufA_{C50S}

Doublet	Attribution	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Aire (%)
I	Fe ²⁺ - octaédrique Ligands N/O	1,17	3,24	14
II	Fe ²⁺ - octaédrique Ligands N/O	1,14	2,52	39
III	Fe ²⁺ - tétraédrique Ligands S	0,85	3,56	7
IV	[4Fe-4S] ²⁺	0,58	1,13	41

Tableau III-2 : Paramètres Mössbauer des doublets constituant le spectre correspondant à la protéine SufA_{C114S}

En conclusion, dans des conditions de reconstitution chimique, chaque mutant simple est capable d'assembler des centres [Fe-S]. Nous n'avons pas réussi, *in vitro*, à discriminer les différentes cystéines comme ligands du centre [Fe-S] dans SufA.

III- Etude du transfert du centre [Fe-S] des mutants à différentes apoprotéines cibles

III-1- A la ferrédoxine

Nous avons ensuite étudié la capacité de chacune des protéines SufA_{C50S}, SufA_{C114S}, SufA_{C116S} à transférer leur centre [Fe-S] assemblé après reconstitution chimique à la ferrédoxine de l'opéron *isc*, une protéine [2Fe-2S]. Les expériences ont été réalisées en boîte à gants, selon le protocole décrit par Ollagnier-de Choudens et coll. (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001). La ferrédoxine sous forme apo a été incubée avec la protéine holoSufA, mutée

pour l'une de ses cystéines conservées, obtenue après reconstitution chimique avec 2 excès de Fe^{2+} et S^{2-} pendant 10 minutes. La quantité introduite a été calculée afin d'avoir 3 excès molaires de fer et de soufre par rapport à la ferrédoxine, sachant que la ferrédoxine est une protéine [2Fe-2S] contenant donc 2 fer/monomère. Pour contrôle, une expérience a été réalisée le même jour avec la protéine SufA sauvage. Après un temps de réaction variable (incubation 30 minutes ou 1 heure), l'échantillon est réduit avec un excès de dithionite, congelé et analysé par spectroscopie RPE. Dans le cas d'un transfert, on doit observer un centre $[\text{2Fe-2S}]^{1+}$ au sein de la ferrédoxine. Ce centre est caractérisé par un signal de spin $S=1/2$, centré à $g=2$, comme figure II-4b. De plus, je rappelle que le centre [Fe-S] dans SufA est instable à la réduction et n'est donc pas visible en RPE.

Pour toutes les protéines mutantes, on observe un signal caractéristique du centre [2Fe-2S] réduit de la ferrédoxine, indiquant que le transfert a bien eu lieu. Il faut noter que, dans chaque cas, on remarque peu d'évolution suivant le temps de réaction étudié (30 minutes ou 1 heure). Après intégration des signaux RPE, dans des conditions non saturantes, il apparaît que la quantité de centre [Fe-S] détectée dans la ferrédoxine est la même après réaction de transfert depuis chaque simple mutant Cys→Ser. Cette expérience ne met donc en évidence aucune différence entre les trois mutants. L'analyse quantitative révèle tout de même que la ferrédoxine contient moins de centres [Fe-S] qu'après un transfert depuis la protéine SufA sauvage : on a pu estimer que la quantité de centre [Fe-S] dans la ferrédoxine était trois fois moins importante dans le cas des protéines mutantes (environ 20 % du fer total) que dans le cas de la protéine SufA sauvage (60 % du fer total). Nous avons vérifié que lorsque la ferrédoxine est incubée avec du fer et du soufre libres, pendant 1 heure, aucun signal n'est détecté après analyse RPE. Ceci démontre que les protéines mutantes, bien que moins efficaces que la protéine sauvage, peuvent transférer leurs centres [Fe-S] à la ferrédoxine, conduisant à une maturation de cette dernière beaucoup plus rapidement qu'à partir de fer et soufre inorganiques. En revanche, aucune différence entre les trois mutants n'a pu être mise en évidence pour le transfert du cluster à la ferrédoxine.

III-2- A la Spore Photoproduct Lyase

Nous avons ensuite étudié la capacité des protéines mutantes de SufA à transférer leurs centres [Fe-S] à une autre protéine cible, la Spore Photoproduct Lyase (SPL), une protéine [4Fe-4S]. La SPL, sous forme apo, a été incubée avec holoSufA, mutée soit au niveau de la cystéine Cys50, soit au niveau de la Cys114, et obtenue après reconstitution chimique avec 2

excès de Fe^{2+} et S^{2-} pendant 10 minutes, et dont la quantité introduite a été calculée afin d'avoir 5 excès molaires de fer et soufre par rapport à la SPL. Après un temps de réaction variable (5 minutes ou 30 minutes), l'activité enzymatique de la SPL (témoin du transfert du centre [Fe-S], comme cela a été expliqué dans la partie II) a été mesurée et comparée à celle enregistrée dans le cas où le transfert est effectué depuis holoSufA sauvage. Le graphe présenté en figure III-3 regroupe les résultats obtenus.

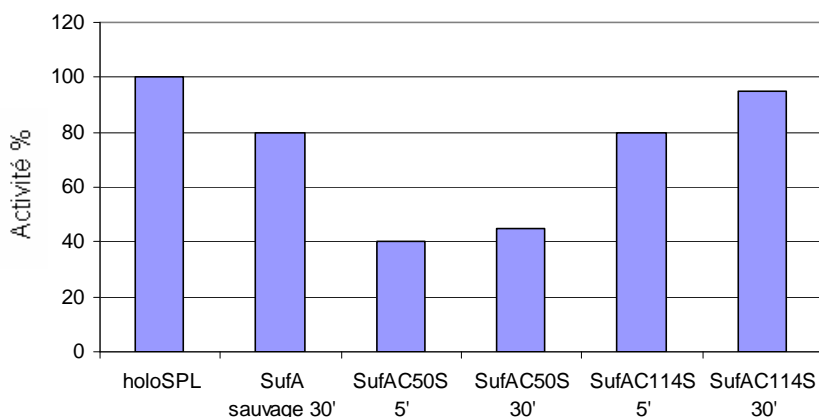


Figure III-3 : histogramme présentant l'activité de la SPL après réaction de transfert depuis SufA_{his}, SufA_{C50S}, SufA_{C114S}.

On remarque que, dans tous les cas, la SPL peut transformer son substrat, mais avec une efficacité différente : l'activité de la SPL est moins importante après un transfert depuis la protéine holoSufA_{C50S} (2 fois moins importante) mais est tout aussi forte après un transfert depuis la protéine holoSufA_{C114S}, par comparaison avec la protéine sauvage.

Ces résultats confirment que tous les mutants sont capables de transférer des centres [Fe-S], ici à la SPL, mais avec une efficacité moindre dans le cas de la protéine SufA_{C50S}. Ce dernier point reste à confirmer puisque cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

IV- Apports des études RMN

Des études par RMN de la protéine SufA ont été réalisées au laboratoire par Nicolas Duraffourg en collaboration avec le Laboratoire de RMN des protéines à l'IBS (Institut de Biologie Structurale). En particulier, des études sur la protéine sauvage reconstituée chimiquement ont été effectuées, l'objectif étant de mettre en évidence l'impact de la

présence du cluster sur les régions de la protéine contenant les cystéines conservées (Cys50, Cys114 et Cys116). Les résultats obtenus sont résumés brièvement dans ce paragraphe. L'ensemble des travaux réalisés sont détaillés dans la thèse de Nicolas Duraffourg intitulée : « Détermination de la structure par RMN d'une protéine impliquée dans la biosynthèse de centres [Fe-S] : SufA ».

Pour ces études, il est nécessaire de préparer des échantillons marqués avec du ^{15}N . Pour cela, la culture de SufA est réalisée en milieu minimum M9, dans lequel l'azote est apporté par du chlorure d'ammonium marqué $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. La purification est ensuite effectuée selon le même protocole que pour la protéine non marquée (voir partie Matériels et méthodes).

Des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) ont été enregistrés pour la protéine SufA contenant un centre [Fe-S] assemblé après reconstitution chimique (effectuée avec 4 excès de Fe^{2+} et S^{2-} pendant 3 heures en conditions anaérobies). La première étape a consisté à attribuer les résidus de la chaîne polypeptidique : tous les résidus ont été attribués (Duraffourg *et al.*, 2004). On étudie alors les modifications structurales de la protéine, en analysant les déplacements chimiques des résidus attribués de SufA. En effet, le centre [Fe-S] au sein de SufA est paramagnétique. Les résidus affectés par ce paramagnétisme sont caractérisés par des déplacements chimiques modifiés et/ou un élargissement spectral.

Le spectre obtenu est présenté en figure III-4 et comparé à celui correspondant à la protéine SufA apo. On remarque que l'intégrité de la protéine SufA est conservée lorsqu'elle contient un centre [Fe-S]. En effet, la variation de déplacement chimique est faible pour l'ensemble des résidus, indiquant que le repliement global de la protéine n'est pas modifié. Toutefois, on peut remarquer que l'intensité du signal de certains résidus a fortement diminué (spectre III-5). Il s'agit des résidus entourant la cystéine Cys50 et ceux entourant les cystéines C-terminales, comme cela est représenté figure III-6. Les pics de ces résidus sont trop larges ou complètement déplacés, hors de la gamme de déplacement chimique, pour pouvoir être observés. L'intensité résiduelle que l'on observe pour ces résidus sur le spectre de la forme holo est certainement due à la présence de protéine sous forme apo.

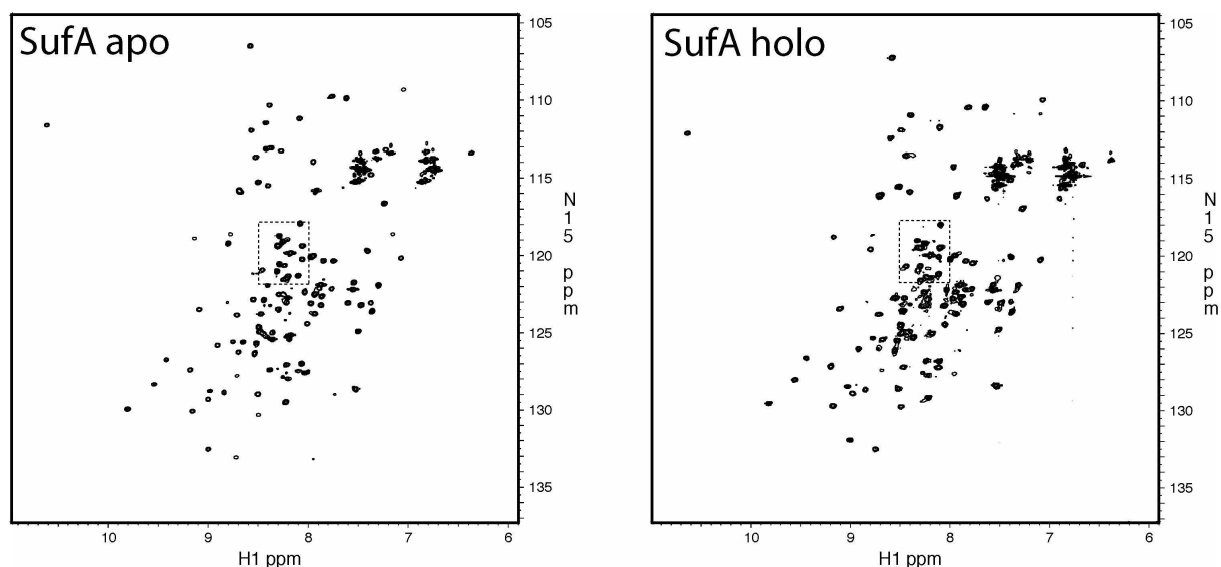


Figure III-4 : comparaison des spectres HSQC des protéines SufA apo et holo, enregistrés à 600 MHz, à 25°C. Le rectangle en pointillé correspond à la région contenant les tâches de résonance des cystéines conservées. Un zoom de cette région est représenté dans la figure suivante (III-5). SufA apparaît ici comme un monomère car les tâches de résonance des deux sous-unités du dimère sont superposables.

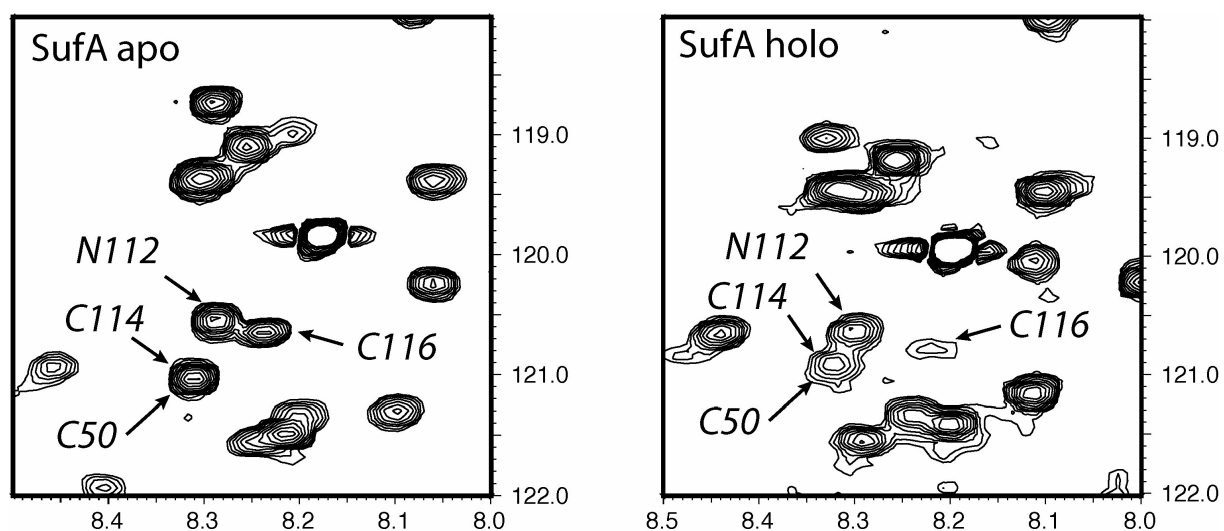


Figure III-5 : comparaison des spectres HSQC des protéines SufA apo et holo, enregistrés à 600 MHz, à 25°C. Seule la partie du spectre contenant les tâches de résonance des cystéines conservées est représentée.

```
MDMHSGETFNP QDFAWQGLTL TPAAAIHIRE LVAKQPGMVG
VRLGVKQTGCAAGFGYVLDLV SEPDKDDLIF EHDGAKLFVP
LQAMPFIDGT EVDFVREGLN QIFKFHNPKA QNECGCGESF GV
```

Figure III-6 : séquence en acides aminés de la protéine SufA. Les zones touchées par le paramagnétisme du cluster sont indiquées par des rectangles bleus.

En conclusion, la région des trois cystéines est affectée par le paramagnétisme du cluster. Toutefois, si on peut conclure que les cystéines conservées sont proches du centre [Fe-S], on ne peut pas affirmer avec nos résultats, qu'elles sont (toutes ?) liées au fer de manière covalente.

Discussion

La protéine SufA d'*E. coli* possède, comme toutes les protéines de type A, trois résidus cystéines conservés, organisés selon le motif caractéristique CX₆₃CGC, et proposés comme étant les ligands du centre [Fe-S]. Nous avons cherché à étudier l'importance de chaque cystéine dans la coordination du cluster. Nous avons montré que les trois mutants simples Cys→Ser de SufA d'*E. coli* sont capables d'assembler des centres [Fe-S] après reconstitution chimique, dans des proportions comparables à la protéine sauvage. Chaque mutant peut également transférer ses centres [Fe-S] à des protéines cibles de type [2Fe-2S] comme la ferrédoxine ou de type [4Fe-4S] comme la Spore Photoproduct Lyase. Cependant, l'efficacité de transfert est en général plus faible que dans le cas de la protéine sauvage. Ainsi, nos expériences ne permettent pas de conclure quant à la nature exacte des ligands du cluster dans SufA. On ne peut discriminer un résidu cystéine par rapport à un autre. Nos résultats montrent que, *in vitro*, SufA est capable de coordonner un centre [Fe-S] même en absence d'une des cystéines ligands. Compte tenu de la localisation des résidus Cys50 et Cys114, il est possible que la géométrie du centre [4Fe-4S] reconstitué chimiquement au sein des protéines SufA_{C50S} et SufA_{C114S} soit différente dans les deux cas : ce point pourrait être étudié en spectroscopie Raman. Finalement, dans nos conditions d'expérience, nous avons observé que SufA est capable de lier un centre [Fe-S] avec seulement deux cystéines. Il est alors possible : (1) que le cluster [Fe-S] soit situé à l'interface de deux monomères, coordonné par deux résidus cystéines de chaque monomère ; (2) que d'autres résidus de la chaîne polypeptidique interviennent pour stabiliser le centre [Fe-S] pouvant être situé au niveau d'un monomère de SufA. Dans ce contexte, on peut noter qu'il existe dans la littérature d'autres exemples de centres [Fe-S] reconstitués chimiquement au sein de protéines mutées au niveau de l'une des cystéines ligands. Les mutants simples Cys→Ala de la petite sous-unité β Ribonucléotide Réductase de classe III en sont des exemples : ils sont toujours capables de coordonner un

centre [4Fe-4S] (Tamarit *et al.*, 2000). De même des mutants simples ou doubles Cys→Ser de la protéine ErpA sont également capables d'assembler des centres [Fe-S] après reconstitution chimique (résultats non publiés). Dans ce cas, il ne reste qu'un seul résidu par chaîne polypeptidique ! Toutefois, il faut noter que dans ce cas, les mutants ne possèdent aucune activité *in vivo* (Loiseau *et al.*, 2007). Ceci peut indiquer que le centre [Fe-S] assemblé au sein des mutants n'est pas correctement assemblé et ne permet pas alors de rendre la protéine fonctionnelle, ou bien que les résultats obtenus *in vitro* ne reproduisent pas les conditions physiologiques. On peut envisager qu'après reconstitution chimique, il est possible de former et stabiliser un centre [Fe-S] au sein de ErpA, en « forçant » les conditions, ce centre n'ayant aucune pertinence physiologique.

Une question similaire peut se poser dans le cas de la protéine SufA. En effet, on peut noter que nous n'avons pas observé, au sein des protéines mutantes, la formation de centre de type [2Fe-2S], dont les proportions étaient également très faibles (< 2 %) dans le cas de la protéine sauvage dans les mêmes conditions. A ce stade, on peut remarquer que ces résultats s'opposent à ceux obtenus avec la protéine SufA native pour laquelle seule des centres de type [2Fe-2S] ont été observés. On peut donc s'interroger sur les mécanismes de formation des centres [Fe-S] dans des conditions *in vitro* qui ne représentent pas les conditions physiologiques.

Afin d'obtenir des informations plus concluantes sur la nature des ligands du cluster au sein de SufA d'*E. coli*, il aurait été intéressant de caractériser la forme native de chaque mutant simple après purification en anaérobiose à partir de tout l'opéron *suf*, comme cela a été réalisé avec la protéine SufA sauvage et décrit dans la Partie II.

Durant ces dernières années, la détermination des ligands du cluster assemblé au sein de protéines de type A a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, des expériences réalisées *in vitro* sur IscA de *Synechocystis* ont montré que seules les cystéines de la partie C-terminale étaient essentielles pour la formation et le transfert du cluster [2Fe-2S] (Wollenberg *et al.*, 2003). D'autre part, les mutants Cys→Ala de Isa1p sont capables de la même façon que la protéine sauvage d'incorporer *in vitro* des centres [2Fe-2S] avec une efficacité de transfert identique (Wu and Cowan, 2003). Enfin, Qui et coll. ont montré que les trois mutants simples Cys→Ala de IscA de *A. ferrooxidans* sont incolores après purification et ne contiennent pas de cofacteur métallique alors que la forme sauvage est isolée, dans les mêmes conditions, avec un centre [4Fe-4S] après purification (Zeng *et al.*, 2007). Ceci suggère que les trois résidus cystéines sont essentiels à la coordination du cluster chez IscA de *A. ferrooxidans*. En

conclusion, l'ensemble des résultats présentés jusqu'à présent, par plusieurs équipes, basés sur des études biochimiques, ne permettent pas de conclure, de manière claire et définitive, quant au rôle exact des trois résidus cystéines dans la coordination du cluster.

Certaines équipes de recherche ont utilisé une approche structurale pour étudier la coordination du cluster. La structure cristallographique de IscA d'*E. coli* sous forme apo a été résolue par deux groupes, celui de Vickery (Cupp-Vickery *et al.*, 2004) et celui de Bilder (Bilder *et al.*, 2004). Ces deux groupes s'accordent à dire que IscA existe sous forme d'un dimère de dimères. Malheureusement, dans les deux cas, seule la cystéine Cys35 est visible dans la densité électronique, située sur une boucle flexible entre deux feuillets β . La séquence CGCGESF, contenant les deux autres cystéines conservées, les cystéines Cys99 et Cys101, est complètement désordonnée, non visible dans la densité électronique. Cupp-Vickery et coll. ont proposé, par modélisation moléculaire, une structure permettant de rendre compte de la présence d'un cluster dans la protéine. Ils proposent ainsi un modèle de IscA avec un centre [2Fe-2S] à l'interface de deux monomères, chaque fer étant coordonné par les deux cystéines C-terminales, la cystéine Cys35 n'intervenant pas (Cupp-Vickery *et al.*, 2004). Selon ce modèle (figure III-7), un atome de fer du cluster peut être lié par des cystéines appartenant à la même chaîne polypeptidique ou appartenant à deux chaînes polypeptidiques différentes. Il est à noter que la structure proposée exclue toute possibilité de formation du centre [Fe-S] à l'interface d'un tétramère.

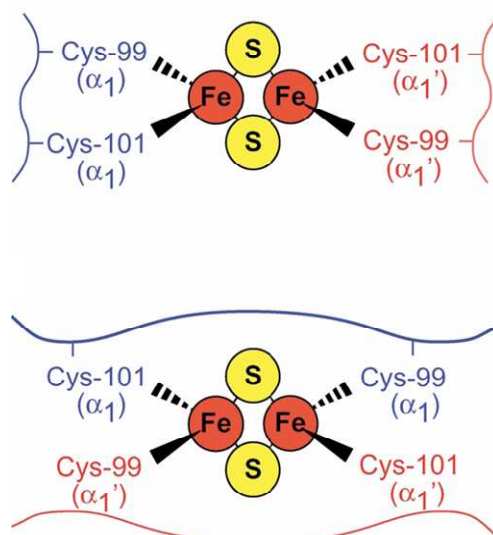


Figure III-7 : modélisation de la coordination du cluster au sein du dimère IscA (Cupp-Vickery *et al.*, 2004)

Une structure cristallographique de SufA d'*E. coli* sous forme apo a également été obtenue, avec une résolution de 2,7 Å, par Takahashi et coll (Wada *et al.*, 2005). SufA existe sous la forme d'un homodimère. Le segment C-terminal de l'un des deux monomères est positionné dans la zone d'interaction avec le deuxième monomère. La boucle comprenant la cystéine Cys50 est observable sur un des monomères. Pour le second monomère, aucune de ces régions (celle contenant les cystéines C-terminales et celle contenant la cystéine Cys50) n'est observée. Par modélisation moléculaire, Wada et coll. proposent que les cystéines Cys114 et Cys116 de chaque monomère participent à la chélation du centre [Fe-S] et excluent la participation de la troisième cystéine, la Cys50.

Récemment Morimoto et coll. ont résolu la première structure cristallographique d'une protéine de type A sous forme holo (Morimoto *et al.*, 2006). En effet, ils ont obtenu la protéine IscA de *T. elongatus* métallée directement après purification. La structure révèle qu'un centre [2Fe-2S] est positionné à l'interface de deux monomères et se trouve coordonné, de façon atypique, par trois cystéines d'un monomère (les Cys35, Cys101 et Cys103) et une cystéine de l'autre monomère (la Cys103) (figure III-8).

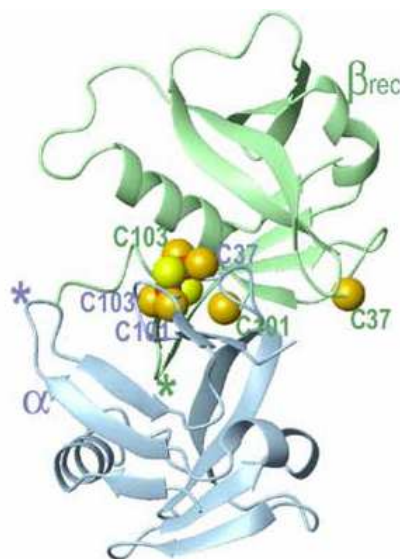


Figure III-8 : structure de IscA de *T. elongatus* liant un centre [2Fe-2S] (Morimoto *et al.*, 2006)

Ainsi, en confrontant ces résultats, on voit bien qu'il n'est pas aisé de déterminer de façon claire et définitive les ligands des centres [Fe-S] au sein des protéines SufA/IscA. Une hypothèse se dégage tout de même : il semble que la forme holo de IscA/SufA soit une entité dimérique liant un centre [Fe-S] à l'interface.

Dans le but d'apporter des éléments de réponse dans la détermination des ligands du cluster, l'objectif du laboratoire est de déterminer la structure de la forme holo de SufA d'*E.*

coli. Ainsi, une étude par RMN de la structure de SufA apo d'*E. coli* a été réalisée au laboratoire par Nicolas Duraffourg, en collaboration avec le laboratoire de RMN à l'IBS (Institut de Biologie Structurale - Grenoble). Ceci constitue une première étape dans l'obtention, à terme, de la structure de la forme métallée. Les résultats obtenus sur la forme apo montrent que les trois cystéines sont situées dans des zones flexibles. D'autre part, les résultats préliminaires, présentés à la fin de ce chapitre, obtenus après analyse de la forme reconstituée de SufA montrent que les trois cystéines conservées sont proches du cluster mais ne permettent pas d'affirmer qu'elles sont liées au fer directement de manière covalente. Des expériences spécifiques de RMN devront être réalisées pour tenter de répondre de façon claire à cette question.

Conclusion générale

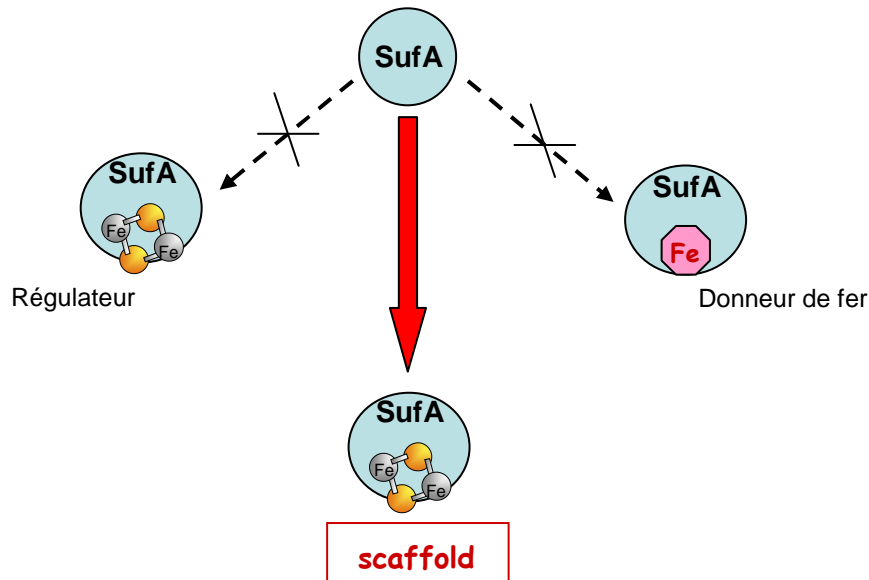
Les protéines [Fe-S] sont des enzymes ubiquitaires dans le monde vivant et assurent des fonctions clé au sein des organismes. La biosynthèse des centres [Fe-S], à savoir les processus qui permettent un assemblage correct des atomes de fer et de soufre au sein de protéines cibles, requièrent la participation de machineries protéiques complexes (NIF, ISC, SUF, CSD). La plupart des protéines impliquées ont été caractérisées d'un point de vue biochimique, et certaines d'un point de vue fonctionnel également. Parmi ces protéines, se trouvent les protéines « scaffold » : celles-ci ont pour rôle de préassembler transitoirement un centre [Fe-S] et de le transférer à diverses apoprotéines cibles. Au sein de l'opéron *suf*, il est proposé que la protéine SufA joue ce rôle. L'ensemble des travaux réalisés dans cette thèse, visant à caractériser la protéine SufA d'un point de vue fonctionnel, a permis de renforcer cette hypothèse.

En fait, l'étude de SufA a été organisée selon trois axes.

◆ Nous nous sommes intéressés à la nature du centre métallique de SufA. Comme déjà mentionné, après purification en conditions aérobies, nous avons observé des traces d'un centre métallique, celui-ci étant très probablement un centre [Fe-S]. Il est possible de reconstituer chimiquement, *in vitro*, un centre [Fe-S] dans SufA, en incubant la protéine avec un excès de Fe^{2+} et de S^{2-} en présence de DTT. Dans ces conditions, nous n'avons pas réussi à déterminer clairement la nature du cluster dans SufA. En effet, quelles que soient les conditions de reconstitution chimique, nous obtenons toujours un mélange de centres de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S], dans des proportions variables. Toutefois, nous avons montré que la reconstitution chimique est un processus rapide : des centres [Fe-S], représentant jusqu'à 65 % du fer total, peuvent être assemblés après seulement quelques minutes de réaction (5 minutes) ; ces centres sont transférables à diverses apoprotéines cibles.

En collaboration avec le laboratoire de W. Outten (Department of Chemistry and Biochemistry, University of South Carolina, Columbia), nous avons pu mettre au point un protocole permettant d'obtenir et de caractériser la protéine SufA native métallée. Celle-ci a été obtenue après purification à partir de tout l'opéron *suf*, en conditions anaérobies. Dans ces conditions, nous avons montré que SufA contient un centre [Fe-S], plutôt de type [2Fe-2S], comme le suggèrent fortement les analyses biochimiques (dosages colorimétriques) et spectroscopiques (UV-visible, et Raman). Ce centre est transférable de manière efficace à une protéine cible (nous avons testé la ferrédoxine comme protéine acceptrice) sans apport d'éléments supplémentaires dans le milieu réactionnel. Toutes ces données nous ont permis de conclure que SufA est une protéine [Fe-S] scaffold. Finalement, ces résultats nous ont permis

de trancher quant à la fonction de SufA, pour laquelle il avait été proposé, par plusieurs équipes qu'elle puisse jouer le rôle de protéine scaffold ou bien de donneur de fer. En revanche, nos études ne permettent pas d'exclure définitivement un rôle de protéine régulatrice. En effet, aucune étude microbiologique n'a été réalisée afin de comparer le comportement de SufA d'*E. coli* par rapport à celui de SufA de *Synechococcus*, démontré par Golbeck et coll. (Balasubramanian *et al.*, 2006). Cette équipe montre qu'une mutation du gène *sufA* de *Synechococcus* entraîne une augmentation des taux d'ARNm des gènes *suf* et *isc* dans des conditions de stress oxydant et proposent que SufA soit un senseur du stress oxydant. Toutefois, nos résultats obtenus montrant que SufA est capable d'assembler et de transférer ses centres [Fe-S] à diverses protéines cibles tendent plutôt à infirmer cette hypothèse.

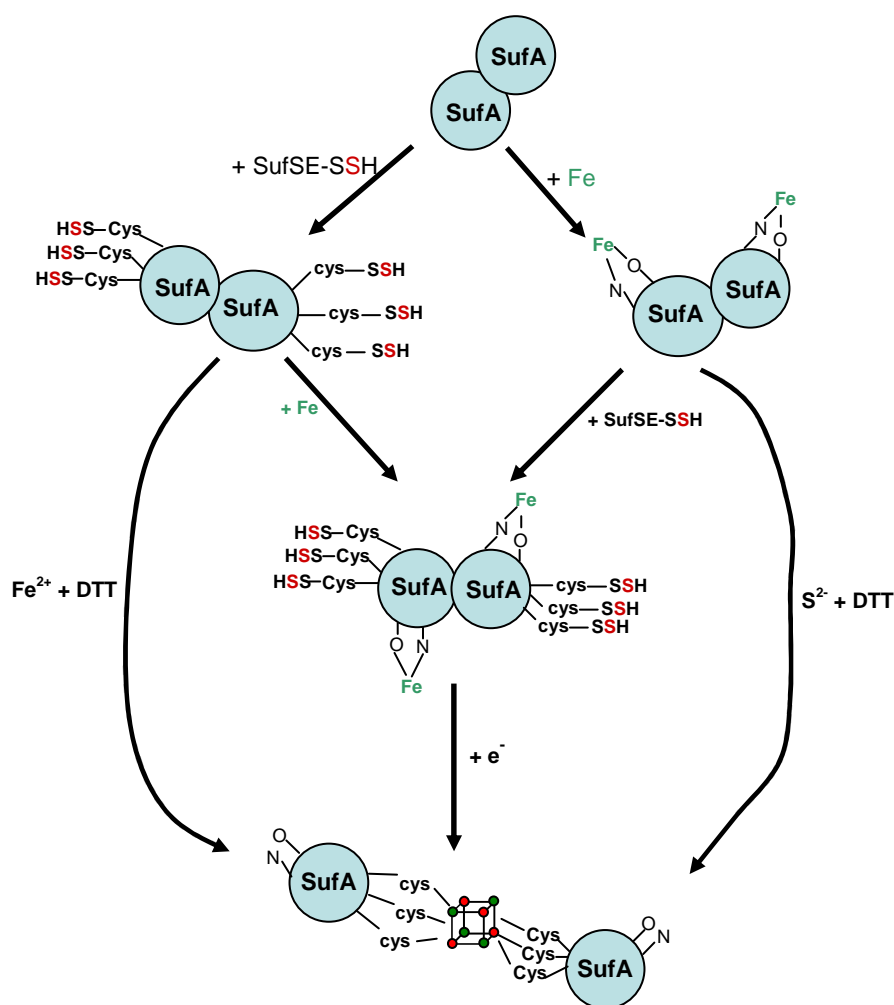


♦ Considérant notre hypothèse selon laquelle la protéine SufA est une protéine [Fe-S] scaffold, nous avons étudié les mécanismes moléculaires de formation du centre [Fe-S] dans SufA. L'idée était de déterminer quel élément, entre le fer et le soufre, est incorporé en premier au niveau du site actif de la protéine, défini par ses trois résidus cystéines conservés.

Nous avons pu montrer que SufA fixe du soufre, sous forme de persulfures/polysulfures au niveau des trois cystéines conservées. Les cystéines C-terminales, Cys114 et Cys116, acceptent du soufre par transfert direct depuis le donneur physiologique, le complexe SufSE, alors que la cystéine Cys50 semble accepter du soufre après transfert interne via les cystéines Cys114 et Cys116.

D'autre part, SufA est capable de fixer du fer (plusieurs atomes de fer par monomère). Les atomes de fer(II) sont liés faiblement à la protéine, comme cela a été montré de façon quantitative, par détermination de la constante d'association de SufA avec le Fe(II). En revanche, les atomes de fer(III) sont assez fortement liés à la protéine. Des analyses par spectroscopie Mössbauer ont montré que les atomes de fer, quel que soit leur degré d'oxydation, sont coordonnés majoritairement par des atomes d'azote ou d'oxygène (80 % à presque 100 %).

Enfin, nous avons observé que chacune des formes intermédiaires (SufA chargée en soufre ou SufA chargée en fer (Fe^{2+})) peut former des centres [Fe-S] après ajout de l'élément manquant mais uniquement en présence d'électrons. En fait, SufA est capable de fixer à la fois du fer et du soufre, en des sites distincts, sans que ces éléments ne réagissent ensemble. En revanche, ces éléments sont tous deux mobilisables pour la formation de centres [Fe-S] après ajout de DTT, et ceci rapidement puisque 5 minutes suffisent pour obtenir le maximum de clusters (environ 50 %). Tous ces résultats sont illustrés par le schéma ci-dessous.



Je rappelle que seuls les atomes de soufre sont localisés au niveau du site actif de SufA ; c'est pourquoi, nous privilégions le mécanisme selon lequel le soufre est incorporé en premier au niveau du site actif. Ceci n'exclut pas le fait que le fer se fixe en premier sur la protéine mais au niveau d'un site différent des résidus cystéines.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication qui est jointe à la fin de ce manuscrit.

♦ Enfin, nous avons cherché à déterminer la nature des ligands du centre [Fe-S] au sein de SufA. En effet, il a été proposé que les résidus cystéines conservés au sein des protéines de type A soient les ligands du centre [Fe-S], bien que le rôle exact des trois résidus ne soit pas clairement établi. Nous avons donc étudié la capacité des protéines SufA mutées au niveau de l'un des résidus cystéines à assembler un centre [Fe-S] après reconstitution chimique. *In vitro*, un cluster peut être assemblé même en absence d'une des cystéines conservées. Le cluster, dans chaque cas, est transférable à une protéine cible, avec tout de même une efficacité souvent plus faible que dans le cas de la protéine sauvage. Nous n'avons donc pas pu, dans les conditions expérimentales utilisées, déterminer l'importance de chacune des cystéines de SufA dans la coordination du cluster. Les expériences préliminaires de RMN sur la forme holo de SufA révèle que les trois cystéines conservées sont proches du cluster (ce qui n'est pas étonnant), sans qu'il soit possible de déterminer de façon certaine que ces résidus soient liés de façon covalente au centre [Fe-S].

Les perspectives de ce travail sont multiples et pourraient permettre de répondre à certaines questions ou incertitudes qui demeurent, quant à la caractérisation du cluster dans SufA.

Tout d'abord, il est important de déterminer de façon claire et non ambiguë la **nature du cluster** dans SufA. Pour cela, il faut tout d'abord optimiser la purification de la protéine SufA en anaérobiose, afin d'augmenter la quantité de fer et de soufre dans la protéine. Il serait alors intéressant de répéter les analyses par spectroscopie Raman sur un nouvel échantillon protéique plus concentré, pour obtenir un meilleur signal et visualiser clairement l'ensemble des bandes de vibration caractéristiques du centre [Fe-S] de SufA. Ceci nous permettrait d'identifier de façon plus sûre la nature du cluster dans SufA. D'autre part, il serait important d'étudier la protéine SufA métallée après purification par spectroscopie Mössbauer (en réalisant la culture bactérienne dans un milieu contenant du ^{57}Fe) afin de confirmer la nature

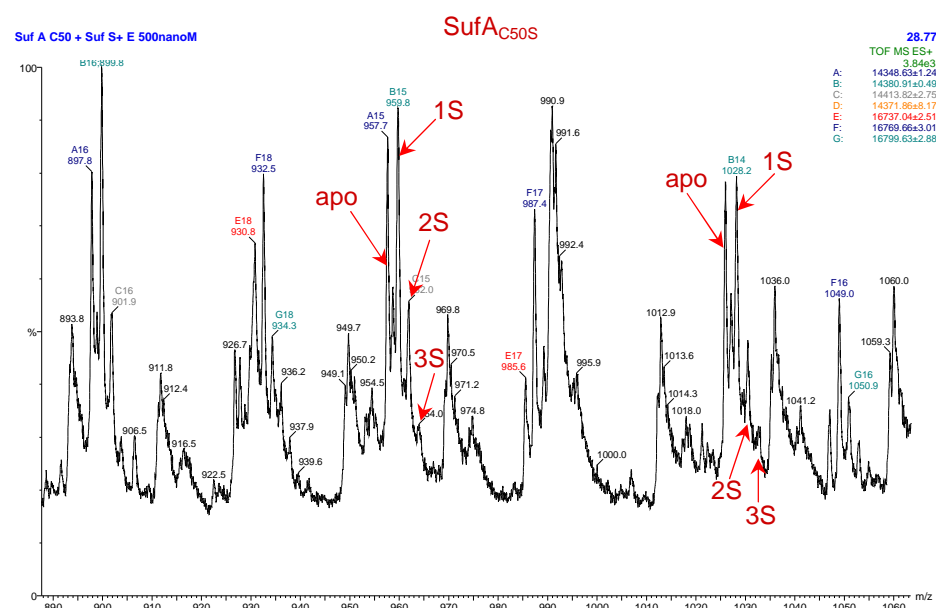
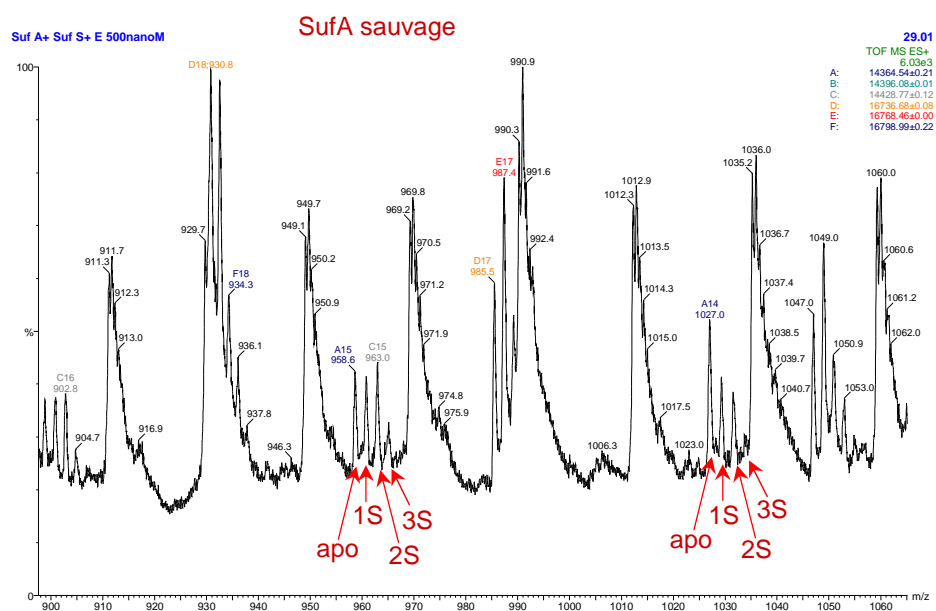
du cluster dans SufA. Cette caractérisation nous permettrait finalement de déterminer si SufA ne contient qu'un seul type de centre *in vivo*. Les études sont en cours au laboratoire.

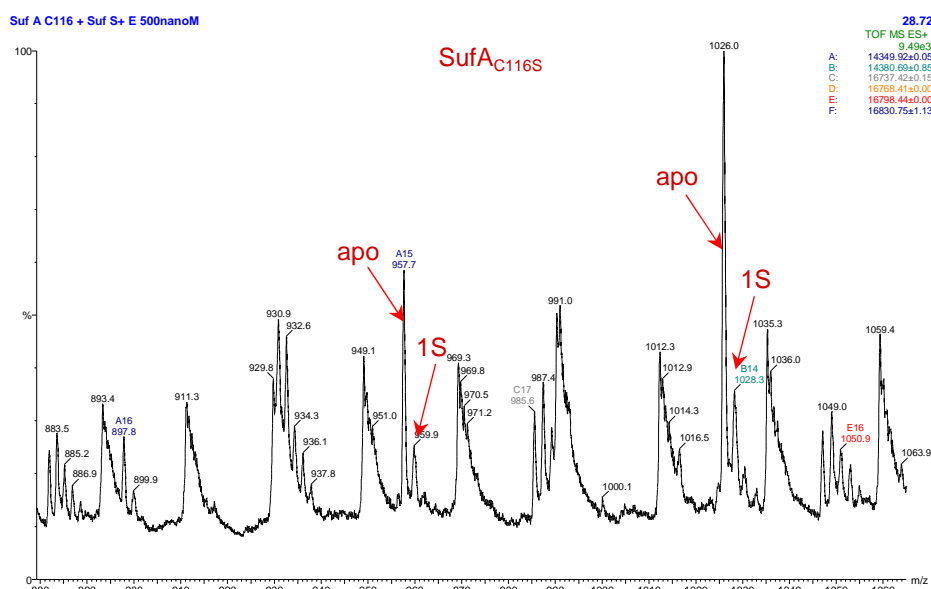
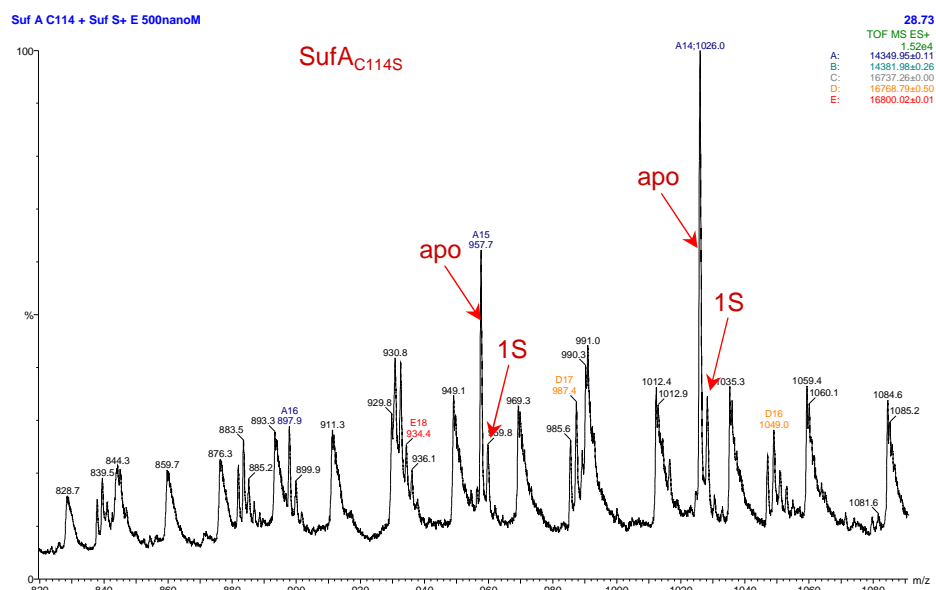
L'étude de la **nature des ligands** du cluster dans SufA constitue un deuxième objectif. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de construire des doubles mutants Cys→Ser et d'étudier leur comportement dans des conditions *in vitro*, afin de savoir s'ils sont capables d'assembler des centres [Fe-S] après reconstitution chimique. Il serait plus important de caractériser la forme native de chaque simple mutant. Cela nécessite de construire des plasmides contenant les six gènes *suf*, le gène *sufA* comportant une mutation au niveau de l'un des résidus cystéines, puis de réaliser la purification en conditions anaérobies, comme cela a été effectué pour la protéine sauvage et décrit dans ce manuscrit. De par ces expériences, il serait peut-être possible de déterminer le rôle de chaque cystéine *in vivo* dans la coordination du cluster. Dans le cas où un ou des mutants lie un cluster, l'objectif serait de déterminer la nature et les proportions des centres [Fe-S] présents dans la protéine mutée et de comparer les résultats à ceux obtenus dans le cas de la protéine sauvage.

Enfin, pour terminer, des études complémentaires par RMN de la forme holo (reconstituée chimiquement) de la protéine sauvage ainsi que de chaque simple mutant pourrait apporter des informations complémentaires pour la détermination des ligands du cluster dans SufA.

Annexes

Annexe 1





Spectres de masse de type ESI-Q-TOF obtenus pour les protéines SufA sauvage et SufA_{C50S}, SufA_{C114S} et SufA_{C116S} après incubation avec le complexe SufSE-SSH et ayant servi aux calculs pour la détermination des proportions relatives des différentes formes de protéines.

Annexe 2

Espèces	δ (mm/s)	ΔE_0 (mm/s)
Fe^{2+}		
Ligands N/O	> 1	2,3 – 3
Ligands S	0,7	3,2 – 3,5
Fe^{3+}		
Ligands N/O	0,45 – 0,5	0,8
Ligands S	0,25	0,5
[2Fe-2S] type Ferrédoxine		
état oxydé	Fe^{3+} 0,25	0,7
état réduit	Fe^{3+} 0,29 Fe^{2+} 0,56	0,6 – 0,8 2,6 – 3,2
[2Fe-2S] type Rieske		
état oxydé	Fe^{3+} (a) 0,32 Fe^{3+} (b) 0,24	0,91 0,52
état réduit	Fe^{3+} 0,31 Fe^{2+} 0,74	0,63 3,05
[4Fe-4S]³⁺	$\text{Fe}^{2,5+} - \text{Fe}^{2,5+}$ 0,4 $\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{3+}$ 0,29	1,03 0,88
[4Fe-4S]²⁺	2x $\text{Fe}^{2,5+} - \text{Fe}^{2,5+}$ 0,45	1,08
[4Fe-4S]¹⁺	$\text{Fe}^{2,5+} - \text{Fe}^{2,5+}$ 0,53 $\text{Fe}^{2+} - \text{Fe}^{2+}$ 0,6	1,14 2
[3Fe-4S]¹⁺	3 Fe^{3+} 0,25	0,5 – 0,7
[3Fe-4S]⁰	$\text{Fe}^{2,5+} - \text{Fe}^{2,5+}$ 0,46 Fe^{3+} 0,3	1,47 0,5

Paramètres Mössbauer des différents centres [Fe-S] et des atomes de fer mononucléaires

Références bibliographiques

-A-

Agar, J.N., Yuvaniyama, P., Jack, R.F., Cash, V.L., Smith, A.D., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000) Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J Biol Inorg Chem* **5**: 167-177.

Aisen, P., Leibman, A., and Zweier, J. (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* **253**: 1930-1937.

-B-

Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**: 1709-1712.

Balasubramanian, R., Shen, G., Bryant, D.A., and Golbeck, J.H. (2006) Regulatory roles for IscA and SufA in iron homeostasis and redox stress responses in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J Bacteriol* **188**: 3182-3191.

Balk, J., Aguilar Netz, D.J., Tepper, K., Pierik, A.J., and Lill, R. (2005a) The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Mol Cell Biol* **25**: 10833-10841.

Balk, J., Pierik, A.J., Aguilar Netz, D.J., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2005b) Nar1p, a conserved eukaryotic protein with similarity to Fe-only hydrogenases, functions in cytosolic iron-sulphur protein biogenesis. *Biochem Soc Trans* **33**: 86-89.

Beinert, H. (1983) Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem* **131**: 373-378.

Beinert, H. (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* **5**: 2-15.

Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J.T., Jarrett, J.T., and Drennan, C.L. (2004) Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* **303**: 76-79.

Bilder, P.W., Ding, H., and Newcomer, M.E. (2004) Crystal structure of the ancient, Fe-S scaffold IscA reveals a novel protein fold. *Biochemistry* **43**: 133-139.

Bonomi, F., Iametti, S., Ta, D., and Vickery, L.E. (2005) Multiple turnover transfer of [2Fe2S] clusters by the iron-sulfur cluster assembly scaffold proteins IscU and IscA. *J Biol Chem* **280**: 29513-29518.

Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T.M., and Dennis Chasteen, N. (2004) Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **341**: 605-615.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Brereton, P.S., Duderstadt, R.E., Staples, C.R., Johnson, M.K., and Adams, M.W. (1999) Effect of serinate ligation at each of the iron sites of the [Fe₄S₄] cluster of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin on the redox, spectroscopic, and biological properties. *Biochemistry* **38**: 10594-10605.
- C-**
- Calzolari, L., Gorst, C.M., Zhao, Z.H., Teng, Q., Adams, M.W., and La Mar, G.N. (1995) ¹H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry* **34**: 11373-11384.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P.I., Di Donato, S., Mandel, J.L., Cocozza, S., Koenig, M., and Pandolfo, M. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**: 1423-1427.
- Castro, L.A., Robalinho, R.L., Cayota, A., Menechini, R., and Radi, R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **359**: 215-224.
- Cavadini, P., Gellera, C., Patel, P.I., and Isaya, G. (2000) Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* **9**: 2523-2530.
- Chandor, A., Berteau, O., Douki, T., Gasparutto, D., Sanakis, Y., Ollagnier-de-Choudens, S., Atta, M., and Fontecave, M. (2006) Dinucleotide spore photoproduct, a minimal substrate of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **281**: 26922-26931.
- Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2006) HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* **45**: 11087-11095.
- Chandramouli, K., Unciuleac, M.C., Naik, S., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2007) Formation and Properties of [4Fe-4S] Clusters on the IscU Scaffold Protein. *Biochemistry* **46**: 6804-6811.
- Chen, O.S., Hemenway, S., and Kaplan, J. (2002) Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12321-12326.
- Cicchillo, R.M., Tu, L., Stromberg, J.A., Hoffart, L.M., Krebs, C., and Booker, S.J. (2005) *Escherichia coli* quinolinate synthetase does indeed harbor a [4Fe-4S] cluster. *J Am Chem Soc* **127**: 7310-7311.
- Clay, M.D., Jenney, F.E., Jr., Hagedoorn, P.L., George, G.N., Adams, M.W., and Johnson, M.K. (2002) Spectroscopic studies of *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase:

- implications for active-site structures and the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc* **124**: 788-805.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson, A.J., Green, J., and Poole, R.K. (2002) NO sensing by FNR: regulation of the Escherichia coli NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *Embo J* **21**: 3235-3244.
- Cui, Q., Thorgersen, M.P., Westler, W.M., Markley, J.L., and Downs, D.M. (2006) Solution structure of YggX: a prokaryotic protein involved in Fe(II) trafficking. *Proteins* **62**: 578-586.
- Cupp-Vickery, J.R., Urbina, H., and Vickery, L.E. (2003) Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from Escherichia coli. *J Mol Biol* **330**: 1049-1059.
- Cupp-Vickery, J.R., Silberg, J.J., Ta, D.T., and Vickery, L.E. (2004) Crystal structure of IscA, an iron-sulfur cluster assembly protein from Escherichia coli. *J Mol Biol* **338**: 127-137.
- D-**
- Ding, B., Smith, E.S., and Ding, H. (2005a) Mobilization of the iron centre in IscA for the iron-sulphur cluster assembly in IscU. *Biochem J* **389**: 797-802.
- Ding, H., and Clark, R.J. (2004) Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem J* **379**: 433-440.
- Ding, H., Clark, R.J., and Ding, B. (2004) IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J Biol Chem* **279**: 37499-37504.
- Ding, H., Harrison, K., and Lu, J. (2005b) Thioredoxin reductase system mediates iron binding in IscA and iron delivery for the iron-sulfur cluster assembly in IscU. *J Biol Chem* **280**: 30432-30437.
- Ding, H., Yang, J., Coleman, L.C., and Yeung, S. (2007) Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *J Biol Chem* **282**: 7997-8004.
- Dobritzsch, D., Schneider, G., Schnackerz, K.D., and Lindqvist, Y. (2001) Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *Embo J* **20**: 650-660.
- Drlica, K., and Rouviere-Yaniv, J. (1987) Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol Rev* **51**: 301-319.
- Duraffourg, N., Choudens, S.O., Fontecave, M., Loiseau, L., Barras, F., Marion, D., and Blanchard, L. (2004) Assignment of the (1)H, (15)N and (13)C resonances of SufA from Escherichia coli involved in Fe-S cluster biosynthesis. *J Biomol NMR* **30**: 379-380.

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E.A., and Marszalek, J. (2004) Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *J Biol Chem* **279**: 29167-29174.

-F-

Field, T.B., Mccourt, J.L., and Mcbryde, W.A.E. (1974) Composition and Stability of Iron and Copper Citrate Complexes in Aqueous-Solution. *Canadian Journal of Chemistry- Revue Canadienne De Chimie* **52**: 3119-3124.

Fish, W.W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* **158**: 357-364.

Flint, D.H. (1996) Escherichia coli contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS gene of Azotobacter vinelandii and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J Biol Chem* **271**: 16068-16074.

Fontecave, M., Mulliez, E., and Logan, D.T. (2002) Deoxyribonucleotide synthesis in anaerobic microorganisms: the class III ribonucleotide reductase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 95-127.

Fontecave, M., Ollagnier-de-Choudens, S., and Mulliez, E. (2003) Biological radical sulfur insertion reactions. *Chem Rev* **103**: 2149-2166.

Fontecave, M. (2006) Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nat Chem Biol* **2**: 171-174.

Foster, M.W., Mansy, S.S., Hwang, J., Penner-Hahn, J.E., Surerus, K.K., and Cowan, J.A. (2000) A mutant human IscU protein contains a stable [2Fe-2S](2+) center of possible functional significance. *Journal of the American Chemical Society* **122**: 6805-6806.

Fujii, T., Maeda, M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N., and Hata, Y. (2000) Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an Escherichia coli counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *Biochemistry* **39**: 1263-1273.

-G-

Garland, S.A., Hoff, K., Vickery, L.E., and Culotta, V.C. (1999) Saccharomyces cerevisiae ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol* **294**: 897-907.

Gerber, J., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* **4**: 906-911.

Goldsmith-Fischman, S., Kuzin, A., Edstrom, W.C., Benach, J., Shastry, R., Xiao, R., Acton, T.B., Honig, B., Montelione, G.T., and Hunt, J.F. (2004) The SufE sulfur-acceptor protein contains a conserved core structure that mediates interdomain interactions in a variety of redox protein complexes. *J Mol Biol* **344**: 549-565.

Gralnick, J.A., and Downs, D.M. (2003) The YggX protein of Salmonella enterica is involved in Fe(II) trafficking and minimizes the DNA damage caused by hydroxyl radicals: residue CYS-7 is essential for YggX function. *J Biol Chem* **278**: 20708-20715.

Gueguen, V., Macherel, D., Neuburger, M., Pierre, C.S., Jaquinod, M., Gans, P., Douce, R., and Bourguignon, J. (1999) Structural and functional characterization of H protein mutants of the glycine decarboxylase complex. *J Biol Chem* **274**: 26344-26352.

Gurbiel, R.J., Ohnishi, T., Robertson, D.E., Daldal, F., and Hoffman, B.M. (1991) Q-band ENDOR spectra of the Rieske protein from *Rhodobacter capsulatus* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase show two histidines coordinated to the [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* **30**: 11579-11584.

-H-

Hausmann, A., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Pierik, A.J., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2005) The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3266-3271.

Hedderich, R., Albracht, S.P., Linder, D., Koch, J., and Thauer, R.K. (1992) Isolation and characterization of polyferredoxin from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. The mvhB gene product of the methylviologen-reducing hydrogenase operon. *FEBS Lett* **298**: 65-68.

Hinchliffe, P., and Sazanov, L.A. (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**: 771-774.

Hjorth, E., Hadfi, K., Zauner, S., and Maier, U.G. (2005) Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **579**: 1129-1135.

Hoff, K.G., Silberg, J.J., and Vickery, L.E. (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7790-7795.

Hoff, K.G., Cupp-Vickery, J.R., and Vickery, L.E. (2003) Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *J Biol Chem* **278**: 37582-37589.

Holland, I.B., and Blight, M.A. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **293**: 381-399.

Huet, G., Daffe, M., and Saves, I. (2005) Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster assembly: evidence for its implication in the pathogen's survival. *J Bacteriol* **187**: 6137-6146.

-J-

Jacobson, M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E., and Dean, D.R. (1989) Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* **219**: 49-57.

- Jensen, L.T., and Culotta, V.C. (2000) Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* **20**: 3918-3927.
 - Johansson, C., Kavanagh, K.L., Gileadi, O., and Oppermann, U. (2007) Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J Biol Chem* **282**: 3077-3082.
 - Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**: 247-281.
 - Johnson, D.C., Unciuleac, M.C., and Dean, D.R. (2006) Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **188**: 7551-7561.
- K-**
- Kato, S., Mihara, H., Kurihara, T., Takahashi, Y., Tokumoto, U., Yoshimura, T., and Esaki, N. (2002) Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5948-5952.
 - Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G., and Lill, R. (2000) Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem* **275**: 15955-15961.
 - Kiley, P.J., and Beinert, H. (2003) The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**: 181-185.
 - Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* **18**: 3981-3989.
 - Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2001) IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **40**: 14069-14080.
 - Kuhnke, G., Neumann, K., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2006) Stimulation of the ATPase activity of the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1p by thiol compounds. *Mol Membr Biol* **23**: 173-184.
 - Kuo, C.F., McRee, D.E., Fisher, C.L., O'Handley, S.F., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A. (1992) Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III. *Science* **258**: 434-440.
 - Kuwahara, J., and Coleman, J.E. (1990) Role of the zinc(II) ions in the structure of the three-finger DNA binding domain of the Sp1 transcription factor. *Biochemistry* **29**: 8627-8631.
- L-**
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., and Lill, R. (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1050-1055.

- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G., and Lill, R. (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* **2**: 715-720.
- Lauble, H., Kennedy, M.C., Beinert, H., and Stout, C.D. (1992) Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* **31**: 2735-2748.
- Law, A.E., Mullineaux, C.W., Hirst, E.M., Saldanha, J., and Wilson, R.J. (2000) Bacterial orthologues indicate the malarial plastid gene ycf24 is essential. *Protist* **151**: 317-327.
- Layer, G., Moser, J., Heinz, D.W., Jahn, D., and Schubert, W.D. (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. *Embo J* **22**: 6214-6224.
- Layer, G., Grage, K., Teschner, T., Schunemann, V., Breckau, D., Masoumi, A., Jahn, M., Heathcote, P., Trautwein, A.X., and Jahn, D. (2005) Radical S-adenosylmethionine enzyme coproporphyrinogen III oxidase HemN: functional features of the [4Fe-4S] cluster and the two bound S-adenosyl-L-methionines. *J Biol Chem* **280**: 29038-29046.
- Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., and Fontecave, M. (2006) Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of Escherichia coli CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J Biol Chem* **281**: 16256-16263.
- Layer, G., Gaddam, S.A., Ayala-Castro, C.N., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Fontecave, M., and Outten, F.W. (2007) SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem*.
- Leal, S.S., Teixeira, M., and Gomes, C.M. (2004) Studies on the degradation pathway of iron-sulfur centers during unfolding of a hyperstable ferredoxin: cluster dissociation, iron release and protein stability. *J Biol Inorg Chem* **9**: 987-996.
- Lee, J.H., Yeo, W.S., and Roe, J.H. (2004) Induction of the sufA operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor. *Mol Microbiol* **51**: 1745-1755.
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B.F., Knight, S.A., Camadro, J.M., and Dancis, A. (2003) Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet* **12**: 879-889.
- Li, D.S., Ohshima, K., Jiralerspong, S., Bojanowski, M.W., and Pandolfo, M. (1999) Knock-out of the cyaY gene in Escherichia coli does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Lett* **456**: 13-16.
- Li, J., Saxena, S., Pain, D., and Dancis, A. (2001) Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem* **276**: 1503-1509.
- Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **30**: 133-141.

- Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsasser, H.P., Hausmann, A., Netz, D.J., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., and Muhlenhoff, U. (2006) Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 652-667.
 - Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 457-486.
 - Lima, C.D. (2002) Analysis of the E. coli NifS CsdB protein at 2.0 Å reveals the structural basis for perselenide and persulfide intermediate formation. *J Mol Biol* **315**: 1199-1208.
 - Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M., and Barras, F. (2003) Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J Biol Chem* **278**: 38352-38359.
 - Loiseau, L., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M., and Barras, F. (2005) Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in Escherichia coli. *J Biol Chem* **280**: 26760-26769.
 - Loiseau, L., Gérez, C., Bekker, M., Ollagnier-de Choudens, S., Py, B., Sanakis, Y., Teixeira de Mattos, J., Fonecave, M., and Barras, F. (2007) Erpa, an iron sulfur (FeS) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in Escherichia coli *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13626-13631.
- M-**
- Mansy, S.S., Wu, S.P., and Cowan, J.A. (2004) Iron-sulfur cluster biosynthesis: biochemical characterization of the conformational dynamics of Thermotoga maritima IscU and the relevance for cellular cluster assembly. *J Biol Chem* **279**: 10469-10475.
 - Mathieu, I., Meyer, J., and Moulis, J.M. (1992) Cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of the rubredoxin gene from Clostridium pasteurianum. *Biochem J* **285** (Pt 1): 255-262.
 - Mettert, E.L., and Kiley, P.J. (2005) ClpXP-dependent proteolysis of FNR upon loss of its O₂-sensing [4Fe-4S] cluster. *J Mol Biol* **354**: 220-232.
 - Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K. (2001) Handbook of metalloproteins. John Wiley and Sons, Ltd, England.
 - Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., and Esaki, N. (1997) Cysteine sulfinase, a NIFS-like protein of Escherichia coli with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *J Biol Chem* **272**: 22417-22424.
 - Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y., and Esaki, N. (1999) A nifS-like gene, csdB, encodes an Escherichia coli counterpart of mammalian selenocysteine lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. *J Biol Chem* **274**: 14768-14772.

- Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., and Esaki, N. (2000) Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J Biochem (Tokyo)* **127**: 559-567.
- Mills, S.A., and Marletta, M.A. (2005) Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**: 13553-13559.
- Morimoto, K., Nishio, K., and Nakai, M. (2002) Identification of a novel prokaryotic HEAT-repeats-containing protein which interacts with a cyanobacterial IscA homolog. *FEBS Lett* **519**: 123-127.
- Morimoto, K., Yamashita, E., Kondou, Y., Lee, S.J., Arisaka, F., Tsukihara, T., and Nakai, M. (2006) The asymmetric IscA homodimer with an exposed [2Fe-2S] cluster suggests the structural basis of the Fe-S cluster biosynthetic scaffold. *J Mol Biol* **360**: 117-132.
- Mortenson, L.E., Valentine, R.C., and Carnahan, J.E. (1962) An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun* **7**: 448-452.
- Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* **11**: 2025-2036.
- Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003a) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J* **22**: 4815-4825.
- Muhlenhoff, U., Stadler, J.A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R.J., Lill, R., and Wiesenberger, G. (2003b) A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J Biol Chem* **278**: 40612-40620.
- Muhlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J.T., Sipos, K., Kispal, G., and Lill, R. (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 36906-36915.
- N-**
- Nachin, L., El Hassouni, M., Loiseau, L., Expert, D., and Barras, F. (2001) SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol Microbiol* **39**: 960-972.
- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D., and Barras, F. (2003) SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *Embo J* **22**: 427-437.
- Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., and Pastore, A. (2004) Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure (Camb)* **12**: 2037-2048.

- Nakai, Y., Nakai, M., Hayashi, H., and Kagamiyama, H. (2001) Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem* **276**: 8314-8320.
- Nakai, Y., Umeda, N., Suzuki, T., Nakai, M., Hayashi, H., Watanabe, K., and Kagamiyama, H. (2004) Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J Biol Chem* **279**: 12363-12368.
- Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T., and Hayashi, H. (2007) Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway. *Mol Cell Biol* **27**: 2841-2847.
- Nakamura, M., Saeki, K., and Takahashi, Y. (1999) Hyperproduction of recombinant ferredoxins in escherichia coli by coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hs cA-fdx-ORF3 gene cluster. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 10-18.
- Netz, D.J., Pierik, A.J., Stumpfig, M., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2007) The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat Chem Biol* **3**: 278-286.
- Nishio, K., and Nakai, M. (2000) Transfer of iron-sulfur cluster from NifU to apoferritin. *J Biol Chem* **275**: 22615-22618.
- Nuth, M., Yoon, T., and Cowan, J.A. (2002) Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of iron nucleation sites for assembly of the [2Fe-2S]₂⁺ cluster core in IscU proteins. *J Am Chem Soc* **124**: 8774-8775.
- O-**
- Ollagnier-de-Choudens, S., Mattioli, T., Takahashi, Y., and Fontecave, M. (2001) Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J Biol Chem* **276**: 22604-22607.
- Ollagnier-de-Choudens, S., Lascoux, D., Loiseau, L., Barras, F., Forest, E., and Fontecave, M. (2003) Mechanistic studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Lett* **555**: 263-267.
- Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., and Fontecave, M. (2004) SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. *J Biol Inorg Chem* **9**: 828-838.
- Ollagnier-de Choudens, S., Nachin, L., Sanakis, Y., Loiseau, L., Barras, F., and Fontecave, M. (2003) SufA from *Erwinia chrysanthemi*. Characterization of a scaffold protein required for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **278**: 17993-18001.
- Ollagnier-de Choudens, S., Loiseau, L., Sanakis, Y., Barras, F., and Fontecave, M. (2005) Quinolinate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *FEBS Lett* **579**: 3737-3743.
- Osborne, M.J., Siddiqui, N., Landgraf, D., Pomposiello, P.J., and Gehring, K. (2005) The solution structure of the oxidative stress-related protein YggX from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **14**: 1673-1678.

Outten, F.W., Wood, M.J., Munoz, F.M., and Storz, G. (2003) The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 45713-45719.

Outten, F.W., Djaman, O., and Storz, G. (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **52**: 861-872.

-P-

Pandolfo, M. (2006) Iron and Friedreich ataxia. *J Neural Transm Suppl*: 143-146.

Pantopoulos, K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* **1012**: 1-13.

Pantopoulos, K., and Hentze, M.W. (1995) Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein : direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1267-1271.

Park, S., Gakh, O., O'Neill, H.A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G.C., and Isaya, G. (2003) Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem* **278**: 31340-31351.

Pastore, C., Adinolfi, S., Huynen, M.A., Rybin, V., Martin, S., Mayer, M., Bukau, B., and Pastore, A. (2006) YfhJ, a molecular adaptor in iron-sulfur cluster formation or a frataxin-like protein? *Structure* **14**: 857-867.

Patzer, S.I., and Hantke, K. (1999) SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 3307-3309.

Pelzer, W., Muhlenhoff, U., Diekert, K., Siegmund, K., Kispal, G., and Lill, R. (2000) Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett* **476**: 134-139.

Peters, J.W., Stowell, M.H., Soltis, S.M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., and Rees, D.C. (1997) Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* **36**: 1181-1187.

Pierrel, F., Douki, T., Fontecave, M., and Atta, M. (2004) MiaB protein is a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in thiolation and methylation of tRNA. *J Biol Chem* **279**: 47555-47563.

Porello, S.L., Cannon, M.J., and David, S.S. (1998) A substrate recognition role for the [4Fe-4S]₂⁺ cluster of the DNA repair glycosylase MutY. *Biochemistry* **37**: 6465-6475.

-R-

Rodriguez-Manzanegue, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109-1121.

Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W., and Walden, W.E. (2003) A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *Embo J* **22**: 4826-4835.

-S-

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., and Craig, E. (1999) Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10206-10211.

Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A., and Kiley, P.J. (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9009-9014.

Seefeldt, L.C., Dance, I.G., and Dean, D.R. (2004) Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. *Biochemistry* **43**: 1401-1409.

Seemann, M., Wegner, P., Schunemann, V., Bui, B.T., Wolff, M., Marquet, A., Trautwein, A.X., and Rohmer, M. (2005) Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *J Biol Inorg Chem* **10**: 131-137.

Sellers, V.M., Johnson, M.K., and Dailey, H.A. (1996) Function of the [2Fe-2S] cluster in mammalian ferrochelatase: a possible role as a nitric oxide sensor. *Biochemistry* **35**: 2699-2704.

Silberg, J.J., Hoff, K.G., Tapley, T.L., and Vickery, L.E. (2001) The Fe/S assembly protein IscU behaves as a substrate for the molecular chaperone Hsc66 from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 1696-1700.

Sillen, L.G. and Martell, A.E. (1964) Stability constants of metal-ion complexes, Publication 17. The Chemical Society, Burlington House.

Singh, A., Guidry, L., Narasimhulu, K.V., Mai, D., Trombley, J., Redding, K.E., Giles, G.I., Lancaster, J.R., Jr., and Steyn, A.J. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11562-11567.

Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R., and Kispal, G. (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* **277**: 26944-26949.

Skovran, E., Lauhon, C.T., and Downs, D.M. (2004) Lack of YggX results in chronic oxidative stress and uncovers subtle defects in Fe-S cluster metabolism in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **186**: 7626-7634.

Smith, A.D., Agar, J.N., Johnson, K.A., Frazzon, J., Amster, I.J., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2001) Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Am Chem Soc* **123**: 11103-11104.

- Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2005a) Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Lett* **579**: 5236-5240.
- Smith, A.D., Jameson, G.N., Dos Santos, P.C., Agar, J.N., Naik, S., Krebs, C., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2005b) NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* **44**: 12955-12969.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F., and Miller, N.E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* **29**: 1097-1106.
- Stehling, O., Elsasser, H.P., Bruckel, B., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2004) Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum Mol Genet* **13**: 3007-3015.
- Strain, J., Lorenz, C.R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G.A., Ta, D.T., Vickery, L.E., and Culotta, V.C. (1998) Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **273**: 31138-31144.
- Switzer, R.L. (1989) Non-redox roles for iron-sulfur clusters in enzymes. *Biofactors* **2**: 77-86.
- T-**
- Ta, D.T., and Vickery, L.E. (1992) Cloning, sequencing, and overexpression of a [2Fe-2S] ferredoxin gene from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 11120-11125.
- Takahashi, Y., and Nakamura, M. (1999) Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 917-926.
- Takahashi, Y., and Tokumoto, U. (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**: 28380-28383.
- Tamarit, J., Gerez, C., Meier, C., Mulliez, E., Trautwein, A., and Fontecave, M. (2000) The activating component of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. An iron-sulfur center with only three cysteines. *J Biol Chem* **275**: 15669-15675.
- Tirupati, B., Vey, J.L., Drennan, C.L., and Bollinger, J.M., Jr. (2004) Kinetic and structural characterization of Slr0077/SufS, the essential cysteine desulfurase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **43**: 12210-12219.
- Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2001) Genetic analysis of the isc operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J Biochem (Tokyo)* **130**: 63-71.
- Tokumoto, U., Nomura, S., Minami, Y., Mihara, H., Kato, S., Kurihara, T., Esaki, N., Kanazawa, H., Matsubara, H., and Takahashi, Y. (2002) Network of protein-protein

interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **131**: 713-719.

Tong, W.H., Jameson, G.N., Huynh, B.H, and Rouault, T.A. (2003) Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a (4Fe-4S) cluster *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9762-9767.

-U-

Unciuleac, M.C., Chandramouli, K., Naik, S., Mayer, S., Huynh, B.H., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2007) In Vitro Activation of Apo-Aconitase Using a [4Fe-4S] Cluster-Loaded Form of the IscU [Fe-S] Cluster Scaffolding Protein. *Biochemistry*.

Ugulava, N.B., Gibney, B.R., and Jarrett, J.T. (2000) *Biochem* Iron sulfur interconversions in biotin synthase : dissociation and reassociation of iron during conversion of [2Fe-2S] to [4Fe-4S] clusters **39**: 5206-5214.

-V-

Vivas, E., Skovran, E., and Downs, D.M. (2006) *Salmonella enterica* strains lacking the frataxin homolog CyaY show defects in Fe-S cluster metabolism in vivo. *J Bacteriol* **188**: 1175-1179.

Vollmer, S.J., Switzer, R.L., and Debrunner, P.G. (1983) Oxidation-reduction properties of the iron-sulfur cluster in *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J Biol Chem* **258**: 14284-14293.

-W-

Wachtershauser, G. (1990) Evolution of the first metabolic cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 200-204.

Wada, K., Hasegawa, Y., Gong, Z., Minami, Y., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2005) Crystal structure of *Escherichia coli* SufA involved in biosynthesis of iron-sulfur clusters: implications for a functional dimer. *FEBS Lett* **579**: 6543-6548.

Wang, T., Shen, G., Balasubramanian, R., McIntosh, L., Bryant, D.A., and Golbeck, J.H. (2004) The sufR gene (sll0088 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803) functions as a repressor of the sufBCDS operon in iron-sulfur cluster biogenesis in cyanobacteria. *J Bacteriol* **186**: 956-967.

Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Muller, H., Lohaus, C., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Meisinger, C., Muhlenhoff, U., Lill, R., and Pfanner, N. (2006) Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *Embo J* **25**: 184-195.

Wilson, R.B. (2006) Iron dysregulation in Friedreich ataxia. *Semin Pediatr Neurol* **13**: 166-175.

Wollenberg, M., Berndt, C., Bill, E., Schwenn, J.D., and Seidler, A. (2003) A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins. *Eur J Biochem* **270**: 1662-1671.

- Wright, C.M., Christman, G.D., Snellinger, A.M., Johnston, M.V., and Mueller, E.G. (2006) Direct evidence for enzyme persulfide and disulfide intermediates during 4-thiouridine biosynthesis. *Chem Commun (Camb)*: 3104-3106.
- Wu, G., Mansy, S.S., Hemann, C., Hille, R., Surerus, K.K., and Cowan, J.A. (2002a) Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Isa1. *J Biol Inorg Chem* **7**: 526-532.
- Wu, G., Mansy, S.S., Wu Sp, S.P., Surerus, K.K., Foster, M.W., and Cowan, J.A. (2002b) Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* **41**: 5024-5032.
- Wu, S.P., Wu, G., Surerus, K.K., and Cowan, J.A. (2002c) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Kinetic analysis of [2Fe-2S] cluster transfer from holo ISU to apo Fd: role of redox chemistry and a conserved aspartate. *Biochemistry* **41**: 8876-8885.
- Wu, S.P., and Cowan, J.A. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. A comparative kinetic analysis of native and Cys-substituted ISA-mediated [2Fe-2S]₂⁺ cluster transfer to an apoferredoxin target. *Biochemistry* **42**: 5784-5791.
- X-**
- Xu, X.M., and Moller, S.G. (2004) AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for Arabidopsis embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9143-9148.
- Xu, X.M., Adams, S., Chua, N.H., and Moller, S.G. (2005) AtNAP1 represents an atypical SufB protein in Arabidopsis plastids. *J Biol Chem* **280**: 6648-6654.
- Y-**
- Yabe, T., Morimoto, K., Kikuchi, S., Nishio, K., Terashima, L., and Nakai, M. (2004) The Arabidopsis chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. *Plant cell* **16**: 993-1007.
- Yavin, E., Stemp, E.D., O'Shea V, L., David, S.S., and Barton, J.K. (2006) Electron trap for DNA-bound repair enzymes: a strategy for DNA-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3610-3614.
- Yeo, W.S., Lee, J.H., Lee, K.C., and Roe, J.H. (2006) IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol Microbiol* **61**: 206-218.
- Yoon, T., and Cowan, J.A. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* **125**: 6078-6084.
- Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 599-604.

-Z-

- Zeng, J., Geng, M., Jiang, H., Liu, Y., Liu, J., and Qiu, G. (2007) The IscA from *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an iron-sulfur protein which assemble the [Fe(4)S(4)] cluster with intracellular iron and sulfur. *Arch Biochem Biophys*.
- Zhang, Y., Lyver, E.R., Knight, S.A., Pain, D., Lesuisse, E., and Dancis, A. (2006) Mrs3p, Mrs4p, and frataxin provide iron for Fe-S cluster synthesis in mitochondria. *J Biol Chem* **281**: 22493-22502.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., and Dean, D.R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2754-2758.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., and Dean, D.R. (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry* **33**: 4714-4720.
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., and Dean, D.R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **273**: 13264-13272.
- Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K.A., Schneider, T.D., and Storz, G. (2001a) Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 4571-4579.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2001b) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**: 4562-4570.

Publication

